

ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В РАСТВОРАХ – ХОРОШО ИЗУЧЕННЫЕ СИСТЕМЫ?

© 2004 Н. О. Мчедлов-Петросян



Мчедлов-Петросян Николай Отарович Химик, доктор химических наук. Докторская диссертация: "Химическое равновесие многофункциональных соединений ксантенового и трифенилметанового рядов в неводных средах" (1992 год). Родился в 1954 году в Тбилиси. В 1976 году окончил химический факультет Харьковского государственного университета. В 1976-1979 годах учился в аспирантуре на кафедре химической метрологии (руководитель: профессор Л. П. Адамович), и с тех пор работает в Харьковском университете. В настоящее время – заведующий кафедрой физической химии. Основной цикл работ посвящен исследованию ионных равновесий в водных и неводных растворах спектроскопическими и электрохимическими методами. Развил и обосновал общую схему протолитических равновесий флуоресцеиновых, родаминовых, фталеиновых и сульфоталеиновых красителей, а также родственных им соединений в растворителях различной природы, в двухфазных и ультрамикрорегетогенных системах. Исследовал проблему поверхностной кислотности и мониторинга поверхностных потенциалов в организованных растворах (мицеллярных растворах коллоидных ПАВ различных типов, микроэмульсиях, суспензиях липосом фосфолипидов), предложил классификацию дифференцирующего действия организованных растворов на силу органических кислот. Ряд работ посвящен проблеме агрегативной устойчивости гидрозолей фуллера C_{60} .

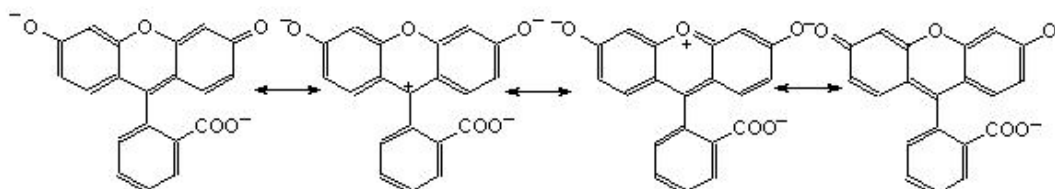
1. Вечнозеленая флуоресценция
2. Ступенчатая диссоциация флуоресцеина в воде и в неводных растворах
3. Детальная схема диссоциации флуоресцеина
4. Влияние растворителя на прототропное равновесие флуоресцеина.
5. Прототропные равновесия галогенпроизводных флуоресцеина в растворах
6. Диссоциация красителей в растворах и ИК спектры
7. Возбужденное состояние и кислотно-основные равновесия
8. Электровосстановление флуоресцеиновых красителей
9. Свойства малоизученных аналогов и производных флуоресцеина
10. Флуоресцеиновые красители в экстракционных системах
11. Взаимодействие флуоресцеиновых красителей с ионами металлов и поведение их в лиофобных коллоидных системах
12. Флуоресцеиновые красители в организованных растворах



Резюме. В статье подводятся итоги многолетних исследований ионных равновесий флуоресцеина, его производных и аналогов в растворах. Табулированы значения pK_a , представлены электронные спектры поглощения ионных и молекулярных форм. Рассмотрено влияние среды на константы ступенчатой диссоциации флуоресцеиновых красителей и таутомерные превращения как в истинных, так и в организованных растворах. Представлены данные о параметрах протолитических равновесий в общей сложности двадцати восемью гидроксиксантенами и их тиоаналогами, а также фенолфталеином и пяти аминоксантенами. Отмечены нерешенные вопросы, касающиеся состояния указанных соединений в растворах.

1. Вечнозеленая флуоресценция

В 1871 году знаменитый немецкий химик Адольф Байер сообщил о синтезе интенсивно флуоресцирующего красителя, названного флуоресцеином [1]. С тех пор более ста тридцати лет этот краситель и его производные относятся к числу наиболее широко применяемых в самых различных областях химии и сопредельных наук. Такой универсальной популярностью и самим своим названием флуоресцеин обязан своей яркой зеленой флуоресценции в растворах в полностью диссоциированном состоянии (рис. 1); образующийся двухзарядный анион представлен ниже в виде нескольких граничных структур:



Квантовый выход флуоресценции двухзарядного аниона флуоресцеина близок к единице, и это делает его незаменимым во всевозможных исследованиях, связанных с испусканием электромагнитных колебаний [2-30]. Остаток фталевой кислоты расположен в пространстве почти перпендикулярно к ксантеновому флуорофору (рис. 2), и сопряжение между этими фрагментами отсутствует.

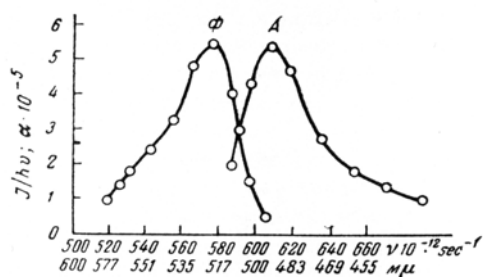


Рис. 1. Спектры флуоресценции и поглощения раствора флуоресцеина в воде с добавкой щелочи, в условиях полного превращения в форму R^{2-} ; по данным М. А. Константиновой-Шлезингер [2].

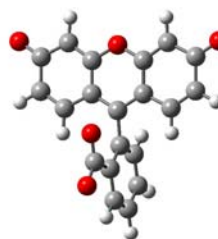


Рис. 2. Пространственная структура дианиона флуоресцеина R^{2-} в вакууме по данным квантово-химических расчетов при помощи метода AM1.

Галогенпроизводные флуоресцеина – эозин, эритрозин, бенгальский розовый А, бенгальский розовый Б, 2,7-дихлорфлуоресцеин и другие также чрезвычайно распространены благодаря своим люминесцентным свойствам [3-10,24,31-64], хотя введение в молекулу тяжелых атомов значительно снижает квантовый выход флуоресценции двухзарядных анионов R^{2-} этих соединений.

История открытия эозина, синтезированного Э. Фишером в диссертационной работе, выполненной под руководством А. Байера, и, в частности, дискуссия между А. Байером и А. Гоффманом о приоритете этого открытия, описаны в обзоре Д. Никерса и О. Вальдеса-Агвилера [10]. Уже в 1885 году Г. Крюсс исследовал влияние замещения атомов водорода в кольце резорцина атомами брома на положение длинноволновой полосы дианиона R^{2-} флуоресцеина в водной и спиртовой щелочи, а опубликованные в 1891 году Е. Фогелем значения $\lambda_{\max}(R^{2-})$ в воде и в спирте хорошо согласуются с современными данными; так в водной среде для дианионов флуоресцеина, 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина, эозина и эритрозина значения λ_{\max} составили 491, 510, 517.5 и 523 нм, а при переходе к спиртовой среде для 16 галогенпроизводных флуоресцеина зарегистрирован bathochromic сдвиг [65].

Е. Фогель [65], а в дальнейшем Дж. Мойр [66] стремились вывести количественные закономерности влияния заместителей (главным образом – галогенов) на положение длинноволновой полосы поглощения дианиона.

С уверенностью можно утверждать, что введение заместителей-галогенов вызывает bathochromic сдвиг полосы поглощения дианиона, особенно при замещении в кольцах резорцина; так, значения $\lambda_{\max}(\text{R}^{2-})$ в воде изменяются от 490 нм для незамещенного флуоресцеина до 548 нм для бенгальского розового Б.

Форма полосы поглощения дианионов R^{2-} также исследовалась уже в ранних работах; так, в диссертации Т. П. Кравца [67] эозин использовался наряду с другими красителями как объект для проверки существующих в то время теорий (Планка, Друде, Лорентца и других). Автор приходит к выводу, что «наблюдаемая абсорбционная кривая представляет собой суперпозицию многих гораздо более тонких элементарных кривых» [67]. В этой же работе исследовано влияние растворителя на полосу поглощения красителя.

Коротковолновое плечо, имеющееся в спектрах поглощения дианионов R^{2-} всех этих красителей, отстоящее от главного максимума примерно на 1000 см^{-1} и отчетливо проявляющееся в зеркально симметричных спектрах испускания (рис. 1), имеет, как известно, колебательную природу [3,68,69].

Вначале исследования касались главным образом фотофизических и фотохимических свойств красителей [3-5,10-16,18,34-39,67], а также поведения их в качестве адсорбционных индикаторов Фаянса [5,70-73] и флуоресцентных индикаторов pH в аналитической химии [5,74]. Уступив полиметиновым красителям главную роль в области фотосенсибилизации [75], красители флуоресцеинового ряда нашли применение при исследовании процессов мицеллообразования коллоидных поверхностно-активных веществ (ПАВ) [45,48,56-58,63,76-87], изучении свойств биомолекул [8-10,31,88-100], индикаторов при двухфазном титровании [101] и т.п.. Начиная с 60-х годов стали также появляться работы, в которых используется способность интенсивно окрашенных и флуоресцирующих анионных форм красителей образовывать тройные комплексы, что, в частности, позволяет применять их в экстракционно-фотометрическом и особенно – в экстракционно-флуориметрическом методах анализа [6,102-112].

Вероятно, первые результаты систематических исследований влияния pH на электронные спектры поглощения гидроксиксантовых красителей (флуоресцеина и двенадцати его галогенпроизводных) в водных растворах были опубликованы в 1924 году В. Холмсом [113]. С тех пор накоплен значительный материал о характере изменений спектров поглощения и флуоресценции красителей данного ряда под влиянием кислотности среды в различных растворителях [9,13-17,28,30-32,34, 59,60,74,75,88-91,96,97,104,114-127]. Имеется также множество публикаций, в которых можно найти значения показателей констант кислотно-основных равновесий ($\text{p}K_a = -\lg K_a$) флуоресцеина, его производных и аналогов [13,15,21,30,34,59,60,75,89,90,96,97, 128-171].¹

* * *

Летом-осенью 1975 года автор настоящей статьи совместно с другими студентами проходил производственную практику на кафедре химической метрологии под руководством профессора Н. П. Комаря. В ходе обсуждения результатов аргентометрического титрования водного раствора иодида калия водным раствором нитрата серебра с эозином в качестве адсорбционного индикатора возник вопрос о целесообразности создания слабокислой среды путем добавления уксусной кислоты (как это рекомендуется в руководстве И. Кольтгофа). От поиска оптимума кислотности среды при применении индикаторов К. Фаянса дискуссия с неизбежностью перешла к проблеме кислотно-основных свойств флуоресцеиновых красителей и надежности имеющихся в литературе констант диссоциации этих соединений в водных растворах.

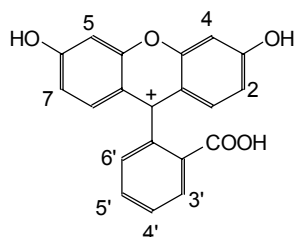
Именно тогда автор настоящей статьи задался целью детально исследовать равновесия флуоресцеина и его производных в растворах – сначала в водных, затем и в неводных, – и с тех пор выполнил как сам, так и, главным образом, со своими сотрудниками и аспирантами серию работ в этом направлении.

Диссоциация флуоресцеина в растворах (за исключением экстремально кислых и щелочных сред) протекает в три ступени:

¹ Мы не даем здесь ссылок на наши работы в этой области, поскольку они будут цитированы по ходу изложения результатов наших экспериментальных исследований.



(используемая нами нумерация констант в общем виде выглядит следующим образом: константа $K_{a(1-z)}$ отвечает равновесию $\text{H}_i\text{R}^z \rightleftharpoons \text{H}_{i-1}\text{R}^{z-1} + \text{H}^+$). Катион флуоресцеина H_3R^+ является, таким образом, трехосновной кислотой; его структура показана ниже:



Более детально протолитическое равновесие флуоресцеина и его производных представлено на схеме 1 (флуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{H}$; эозин, или 2,4,5,7-тетрабромфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{Br}$; $\text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{H}$; эритрозин, или 2,4,5,7-тетраиодфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{I}$; $\text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{H}$; 2,7-дихлорфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{H}$, $\text{Y} = \text{Cl}$; 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{H}$; $\text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{Cl}$, флоксин А, или 2,4,5,7-тетрабром-3',6'-дихлорфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{Br}$; $\text{Z}^1 = \text{Cl}$, $\text{Z}^2 = \text{H}$; флоксин Б, или 2,4,5,7-тетрабром-3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{Br}$; $\text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{Cl}$; бенгальский розовый А, или 2,4,5,7-тетраиод-3',6'-дихлорфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{I}$; $\text{Z}^1 = \text{Cl}$, $\text{Z}^2 = \text{H}$; бенгальский розовый Б, или 2,4,5,7-тетраиод-3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеин: $\text{X} = \text{Y} = \text{I}$; $\text{Z}^1 = \text{Z}^2 = \text{Cl}$). По систематической номенклатуре окрашенная хиноидная структура флуоресцеина, III, называется: 2-(6-гидрокси-3-оксо-3Н-ксантен-9-ил)-бензойная кислота, а бесцветный лактон, IV: 3',6'-дигидроксиспиро[изобензофуран-1(3Н),9'-(9Н)ксантен]-3-он.

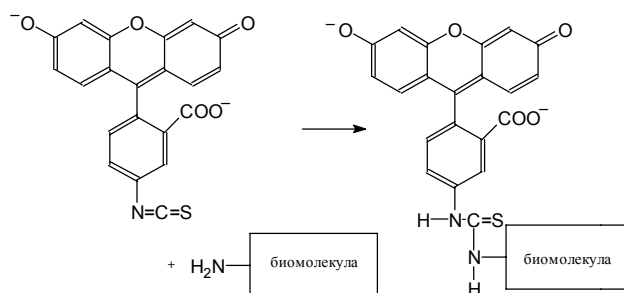
Эта схема отражает наиболее вероятное, по мнению большинства исследователей, строение ионов и молекул флуоресцеина и его производных. Круг объектов постепенно расширялся, и сейчас имеется возможность собрать воедино полученный фактический материал и сделать некоторые обобщения.

Подобная сводка полезна хотя бы потому, что в течение всех прошедших лет в литературе периодически появлялись публикации различных исследователей, посвященные данной теме. К сожалению, при этом работы советских и постсоветских авторов часто не цитируются и не рассматриваются зарубежными исследователями (*nomina sunt odiosa*...). Поэтому необходимо дать возможно более объективную картину на основе всего накопленного материала.

Это тем более важно, поскольку сегодня флуоресцеин и другие гидроксиксантенные красители не только не утратили своего значения, но и находят все более широкое применение как в традиционных, так и в новых областях химии и сопредельных наук. В частности, флуоресцеиновые красители используются в сенсорных устройствах [172-180], в моно слоях и пленках Лэнгмюра-Блоджетт [181-187], в иммуноанализе в составе микрочипов [94], при создании молекулярных маяков [188], в нанохимии и в супрамолекулярной химии [189-193].

Новые перспективы открывает использование фотофизических и фотохимических свойств ранее практически не исследовавшихся производных и аналогов флуоресцеина [59,194-201].

Ряд публикаций в последние десятилетия посвящен спектрам поглощения и испускания и константам диссоциации в водно-органических смесях и в мицеллярных растворах ПАВ [24,41-44,47-49,56-58,60-63,83,87,125,145-147,159,161-164,170,175,176, 202,203]. Очень велик поток новых работ, посвященных применению флуоресцеиновых красителей в биохимии [6,8-10,91-100]. При этом часто осуществляется ковалентная привязка флуорофора к биомолекулам через группу NCS флуоресцеин-изотиоцианата (ФИТЦ), в приводимом ниже случае – изомера I:



Ковалентная привязка практикуется и для фиксации флуоресцеина на поверхности частиц SiO_2 [204]. В ряде случаев связывание с поверхностью мицелл ПАВ и биомембран, а также адсорбция на границах раздела вода/электрод и вода/воздух достигается не только соединением остатка фталевой кислоты с фосфолипидами [90,96,165,181], но и введением длинных углеводородных радикалов, придающих молекулам и ионам повышенную гидрофобность [159,184-187,203,205-208]; в некоторых случаях целесообразно в конце углеводородной цепи помещать карбоксильную группу [97]. В частности, модифицированные длинными углеводородными хвостами флуоресцеин и эозин служат двухфазными кислотно-основными индикаторами при

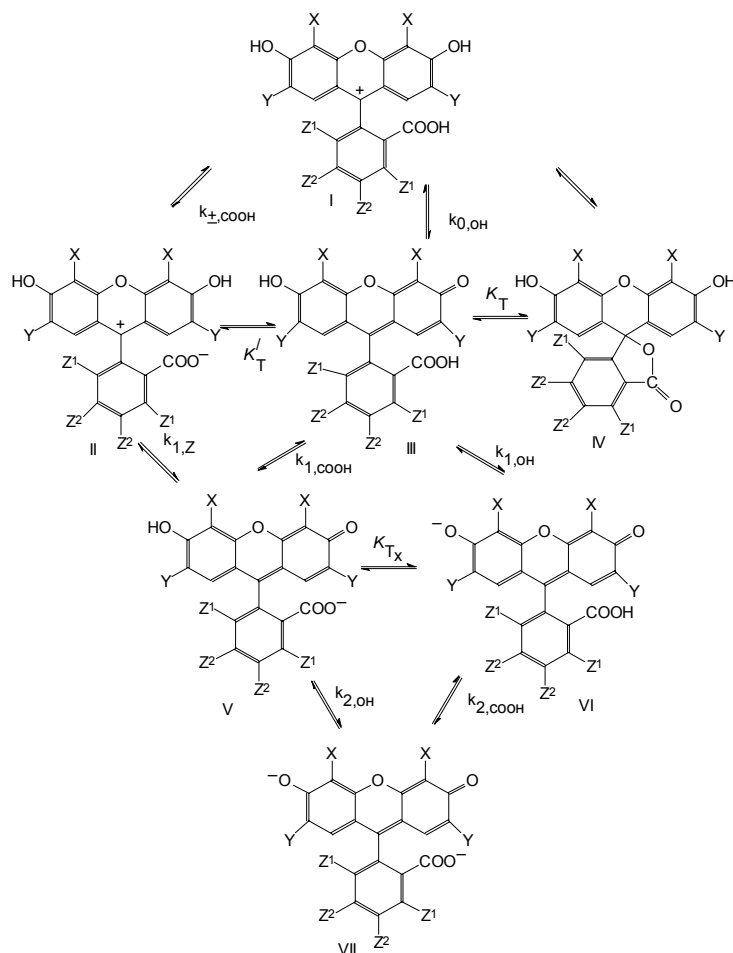


Схема 1. Протолитические равновесия гидроксисантоновых красителей.

$$K_T = [IV]/[III]; K'_T = [II]/[III]; K''_T = K_T / K'_T = [IV]/[II]; K_{Tx} = [VI]/[V];$$

$$k_{\pm, \text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{II}} / a_{\text{I}}; k_{0, \text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{III}} / a_{\text{I}}; k_{1, \text{Z}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{V}} / a_{\text{II}}; k_{1, \text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{V}} / a_{\text{III}};$$

$$k_{1, \text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VI}} / a_{\text{III}}; k_{2, \text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VII}} / a_{\text{V}}; k_{2, \text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VII}} / a_{\text{VI}}.$$

исследовании биокаталитических процессов [205-207]. Во всех этих случаях эксплуатируются прежде всего и главным образом флуоресцентные свойства двухзарядного аниона красителя, оказывающегося в неводном микроокружении.

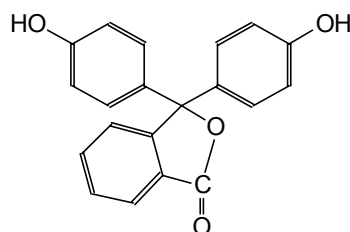
Вероятно, поэтому в самое последнее время вновь возрос интерес к влиянию растворителя на положение протолитических равновесий флуоресцеина [69,175] и к электронным спектрам поглощения и флуоресценции отдельных ионных форм [28,30,170,209]. Интенсивно исследуются кислотно-основные свойства флуоресцеина в возбужденном состоянии [28] и колебательные спектры в водных растворах [210]. Мотивацией недавнего детального исследования кислотно-основных равновесий флуоресцеина в воде при различных ионных силах и температурах, выполненного С. Смитом и В. Преториусом, является исключительная ценность флуоресцеина, а именно – его интенсивно флуоресцирующей дианионной формы R^{2-} , – как трейсера для исследования водных систем [29].

Квантово-химические расчеты уже давно применялись для выяснения электронного строения различных форм флуоресцеина [19,20,28,209-217]. В последнее время появилась также работа, в которой на основании расчетов *ab initio* делаются выводы о преобладании тех или иных таутомеров нейтральной и анионных форм флуоресцеина не только в газовой фазе, но и в растворителях различной полярности [218].

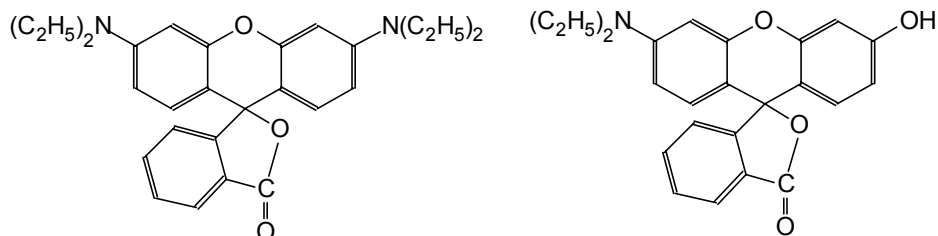
В связи со всем вышесказанным следует задаться вопросом: достаточно ли хорошо на сегодня изучены флуоресцеиновые красители и вполне ли понятны закономерности влияния растворителя (или микроокружения – в случае организованных растворов) на положение равновесий и на спектры этих соединений?

Кроме того, детальная схема равновесий гидроксиксантоновых красителей (схема 1) открывает уникальные возможности для иллюстрации влияния природы растворителя на равновесия сложных соединений в неводных и организованных растворах. Исследование такого влияния является в настоящее время одной из составных частей тематики кафедры физической химии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина.

По своей структуре флуоресцеин напоминает другой краситель, синтезированный А. Байером годом позже, а именно фенолфталеин, бесцветная лактонная форма которого представлена ниже:



Лактонный цикл в этом случае гораздо прочнее, чем у флуоресцеина, поэтому нейтральная форма фенолфталеина как в растворах, так и в твердом состоянии существует только в виде этого таутомера. В некоторых случаях бывает полезным сравнить спектральные и кислотно-основные свойства флуоресцеина со свойствами аминоксантонового красителя родамина Б, а также «гибрида» флуоресцеина и родамина Б, *N,N*-диэтилродола; оба эти соединения изображены ниже в виде лактонных таутомеров:



В литературе накоплено большое количество данных по протолитическому поведению гидроксиксантоновых красителей в органических растворителях. Однако значительная часть этих сведений получена при помощи спектров поглощения и флуоресценции в безбуферных смесях, в условиях варьирования состава смешанного растворителя. В подобных случаях, как было показано нами, возможно одновременное изменение положений кислотно-основных и тауто-

мерных равновесий, накладывающихся на сольватохромные эффекты, не говоря уже об изменении характера ионной ассоциации. Поэтому для получения надежных выводов о влиянии растворителя на протолитические свойства флуоресцеиновых красителей, в частности, для проверки общих закономерностей, ранее сформулированных в работах Бренстеда, Кольтгофа, Измайлова, Бейтса, Белла и других авторов для кислот более простого строения, необходимо корректное определение констант диссоциации.

2. Ступенчатая диссоциация флуоресцеина в воде и в неводных растворах

Методология исследований. Значения показателей смешанных констант диссоциации, pK_a , в водных растворах были найдены при помощи спектрофотометрического метода, обычно – в буферных смесях с невысокой ионной силой, при низких концентрациях красителей, как правило, порядка 10^{-5} М. Такой выбор условий экспериментов объясняется прежде всего низкой растворимостью нейтральных (молекулярных) форм красителей в воде и высокими коэффициентами молярного поглощения ионных форм, а также возможной агрегацией красителей в концентрированных растворах. Значения pH определялись при помощи стеклянных электродов в цепях с переносом. В неводных средах мерой кислотности служили значения $pa_{H^+}^*$, стандартизованные к гипотетическому раствору в данном растворителе с единичной активностью ионов лиония и со свойствами бесконечно разбавленного раствора [219,220]; они либо определялись при помощи стеклянных электродов в градуированных надлежащим образом цепях с переносом, либо рассчитывались на основании данных о константах диссоциации буферных кислот. Все константы выражены в шкале концентраций моль/л (М).

Использовались препараты флуоресцеина и других ксантеновых красителей высокой чистоты, причем контроль, а иногда и очистка осуществлялись при помощи хроматографических методов. Большую роль играет чистота растворителя; так, нами было показано [221, 222], что некоторые эффекты, наблюдавшиеся для флуоресцеина [223] и эозина [123] в диоксановых растворах, обусловлены образованием пероксидов 1,4-диоксана.

Составы растворителей в наших работах выбирались таким образом, чтобы можно было пренебречь ассоциацией ионов флуоресцеина и других ксантеновых красителей с компонентами буферных смесей. Как правило использовались растворители со значениями относительной диэлектрической проницаемости, ϵ , не ниже 24. Для получения термодинамических значений pK_a использовано второе приближение уравнения Дебая–Хюккеля. В некоторых случаях, в частности, в *n*-бутаноле, было необходимо также учитывать ассоциацию анионов буферных кислот с ионами щелочных металлов, а при изучении равновесий в *N,N*-диметилформамиде (ДМФА) – и гомосопряжение, т.е. комплексообразование буферных кислот с собственными анионами. Вместе с константами были также получены электронные спектры поглощения всех брутто-форм (катионов, молекул, анионов, дианионов).

Препятствием исследованию протолитических равновесий может оказаться димеризация красителей либо образование более сложных агрегатов. Но значения констант димеризации ионов R^{2-} в воде достаточно малы (так, для флуоресцеина, эозина, эритрозина и бенгальского розового Б при температуре 20-28 °С они составляют соответственно 5, 110-115, 127-140 и 250 [224-226], а в водно-органических смесях и в таких растворителях, как спирты и ДМФА, агрегация ослабляется вследствие хорошей сольватации крупных органических ионов и молекул красителей (движущей силой агрегации красителей в воде в значительной мере служит гидрофобное взаимодействие, имеющее энтропийную природу [227]). Имеющиеся в литературе данные об изменении спектров поглощения гидроксиксантенов при варьировании концентрации в водных [228], водно-органических [229] и органических [230,231] растворителях объясняются сдвигом положения кислотно-основных равновесий в безбуферных системах [221,232]. Большинство наших спектрофотометрических исследований проведено в области концентраций порядка 10^{-5} М; более высокие концентрации использовались в неводных средах при измерении спектров нейтральных форм красителей, в значительной мере превращающихся в бесцветные лактонные таутомеры. Как правило были использованы длинноволновые полосы поглощения красителей в электронных спектрах, отвечающие переходу электронной системы в низшее возбужденное состояние; полные спектры и обсуждение природы полос можно найти в литера-

туре [3,7,13,16,20,26,28,49,50,65-69,75,115-117,168-170,213-215,217,233-239]. Выполнение закона Бугера при различной кислотности среды дает основание не считаться с фактором димеризации (агрегации). Во всех случаях рекомендуется контролировать адсорбцию на стекле посуды и кювет, так как красители вообще и гидроксиксантеновые соединения в частности проявляют склонность к адсорбции из растворов на твердых поверхностях.

Типичные примеры зависимостей светопоглощения флуоресцеина от кислотности среды даны на рисунках 3 и 4.

Основное уравнение, связывающее поглощение (оптическую плотность) A при текущем значении pH ($\text{pH} = -\lg a_{\text{H}^+}$) со значениями констант диссоциации и поглощением индивидуальных ионных (молекулярной) форм при фиксированной длине волны, концентрации красителя и толщине светопоглощающего слоя, имеет следующий вид:

$$A = \frac{A_{\text{H}_3\text{R}^+}(a_{\text{H}^+})^3 + A_{\text{H}_2\text{R}}(a_{\text{H}^+})^2 K_{a0} + A_{\text{HR}^-} a_{\text{H}^+} K_{a0} K_{a1} + A_{\text{R}^{2-}} K_{a0} K_{a1} K_{a2}}{(a_{\text{H}^+})^3 + (a_{\text{H}^+})^2 K_{a0} + a_{\text{H}^+} K_{a0} K_{a1} + K_{a0} K_{a1} K_{a2}} \quad (4)$$

Значения A в условиях, когда весь краситель переходит в формы H_3R^+ , H_2R , HR^- и R^{2-} соответственно, обозначены через $A_{\text{H}_3\text{R}^+}$, $A_{\text{H}_2\text{R}}$, A_{HR^-} и $A_{\text{R}^{2-}}$. В случае флуоресцеина лишь значения $A_{\text{H}_3\text{R}^+}$ и $A_{\text{R}^{2-}}$ в общем случае могут быть измерены непосредственно («по насыщению»).

Для определения констант диссоциации использовались большие массивы значений pH и широкие участки спектров. При достаточно высоких содержаниях органических растворителей равновесие (1) можно рассматривать изолированно и определять значение $\text{p}K_{a0}$ отдельно от двух других констант. В водных растворах все три равновесия (1), (2) и (3) должны быть рассмотрены совместно.

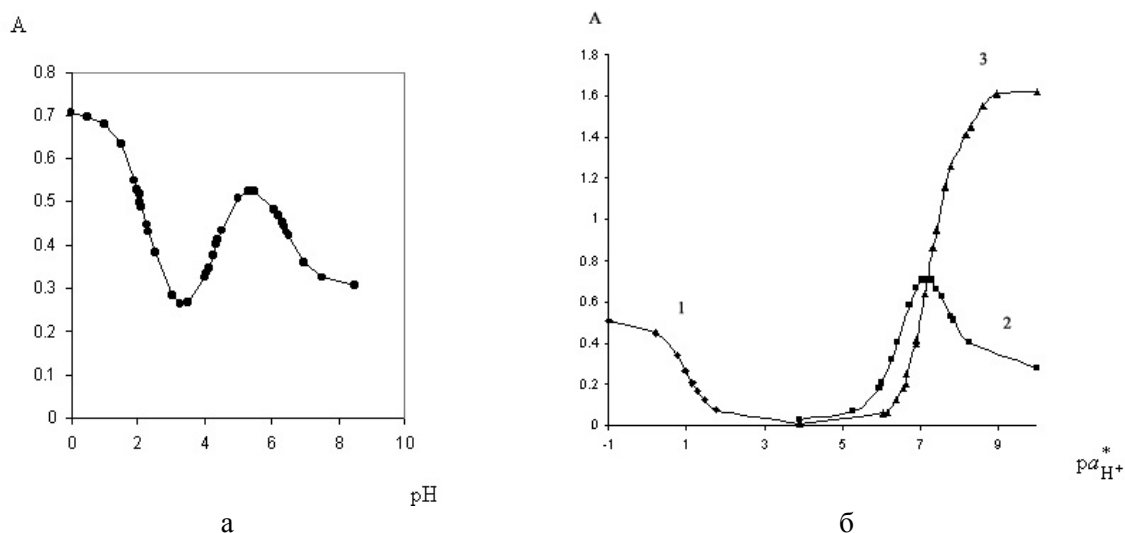


Рис. 3. Зависимость светопоглощения растворов флуоресцеина от pH: а) в водном растворе, $I = 1.80$ (KCl), длина волны 449 нм, длина кюветы 2.008 см, концентрация красителя $9.38 \cdot 10^{-6}$ М [240]; б) в 33 %-ном (по массе) водном ацетоне: 1 – длина волны 440 нм, длина кюветы 1.00 см, концентрация красителя $8.928 \cdot 10^{-6}$ М, в качестве pH использованы значения $-\lg C(\text{HClO}_4)$ или $-\lg C(\text{HCl})$; 2 – длина волны 425 нм, длина кюветы 5.00 см, концентрация красителя $1.55 \cdot 10^{-5}$ М; 3 – длина волны 495 нм, данные приведены к длине кюветы 1.00 см, концентрация красителя $1.85 \cdot 10^{-5}$ М [242].

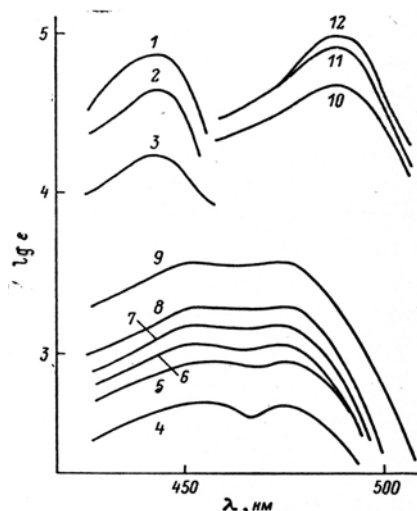


Рис. 4. Электронные спектры поглощения флуоресцеина в метиловом спирте при различной кислотности: 1 – 1.7-0.17 М HCl (спектр H_3R^+); 2 – $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 3.0$; 3 – $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 3.7$; 4 – $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 5.7-6.9$ (спектр H_2R); 5-9: $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 8.5, 8.9, 9.1, 9.3, 10.0$ (бензоатные буферные растворы); 10 – $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 11.5$; 11 – $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 11.8$ (верональные буферные растворы); 12 – $\text{p}a_{\text{H}^+}^* = 14.6$ (спектр R^{2-}) [242].

4.25 и $\text{p}K_{a2} = 6.46$, причем равновесия диссоциации рассматривались как изолированные друг от друга [143]. Значения $\text{p}K_{a0} = 2.30$, $\text{p}K_{a1} = 4.60$ и $\text{p}K_{a2} = 7.00$ приведены без указания ионной силы и способа расчета [148]. Значения $\text{p}K_{a0} = 2.25$, $\text{p}K_{a1} = 5.1$ и $\text{p}K_{a2} = 7.1$ [136] были найдены при $I = 2.0$ М (NaCl) и 30°C ; при этих же условиях полярографический метод дал значения $\text{p}K_{a0} = 2.0$, $\text{p}K_{a1} = 4.75$ и $\text{p}K_{a2} = 7.0$ [136]. Более современные литературные данные будут рассмотрены ниже.

Нами при $I = (0.002-0.01)$ М были найдены значения $\text{p}K_{a0}$, $\text{p}K_{a1}$ и $\text{p}K_{a2}$ и пересчитаны к термодинамическим при помощи уравнения Дебая-Хюккеля (второе приближение). Эти данные, а также значения $\text{p}K_a$ других красителей, о которых речь еще пойдет ниже, представлены в таблице 1.

Солевые эффекты в водных растворах носят для флуоресцеина традиционный характер (в литературе давно уже имеются большие сводки данных о коэффициентах активности органических ионов и молекул в водных растворах, например, обзор Н. П. Комаря, в котором подводятся итоги определения полного набора параметров равновесий реагентов в водно-солевых растворах [261]). Так, зависимости показателей смешанных констант диссоциации от ионной силы в водных растворах KCl (0.05-2.3 М) выглядят следующим образом [262,263]:

$$\text{p}K_{a0} = 2.14 + 0.50 I^{1/2} - 0.32 I + 0.04 I^{3/2}; \quad (5)$$

$$\text{p}K_{a1} = 4.45 - 0.64 I^{1/2} + 0.46 I - 0.07 I^{3/2}; \quad (6)$$

$$\text{p}K_{a2} = 6.80 - 1.34 I^{1/2} + 1.09 I - 0.22 I^{3/2}; \quad (7)$$

(впоследствии сравнительно близкие результаты для $\text{p}K_{a2}$ были получены в растворах NaCl при $I \leq 1.0$ М [168], но в качестве термодинамического шведские авторы приводят заниженное, с нашей точки зрения, значение: 6.43 [168]). На положение таутомерных равновесий флуоресцеина концентрация KCl также не оказывает заметного влияния.

Подробности определения констант имеются в цитированных работах. Расчеты констант диссоциации проводились с учетом перекрывания сопредельных равновесий при помощи различных алгоритмов [243], некоторые из которых были предложены нами и уже обсуждались в специальной литературе [244]. Результаты, полученные нами в 80-е годы, были в дальнейшем подтверждены с использованием новых расчетных программ.

Равновесия в водных растворах. Еще в 1958 году В. Цанкер и В. Петер опубликовали для флуоресцеина значения $\text{p}K_{a0} = 1.95$, $\text{p}K_{a1} = 5.05$ и $\text{p}K_{a2} = 7.00$ [120], относящиеся, по-видимому, к водным растворам. Графические методы оценки $\text{p}K_a$ по спектрофотометрическим данным, в том числе при ионной силе $I = 0.01$ М, привели к значениям $\text{p}K_{a0} = 2.2$, $\text{p}K_{a1} = 4.4$ и $\text{p}K_{a2} = 6.7$ [13,129]. В некоторых работах определялись лишь значения $\text{p}K_{a1}$ и $\text{p}K_{a2}$; так, имеются значения 4.38 и 6.99, соответственно [132]. При $I = 0.1$ М при помощи спектрофотометрического метода были определены значения $\text{p}K_{a1} =$

Таблица 1. Значения pK_a красителей в воде (20-25 °C) [221,242,243,245-260]

Соединение	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}
Флуоресцеин	2.14 ± 0.01	4.45 ± 0.02	6.80 ± 0.01
Сульфофлуоресцеин	—	3.22 ± 0.11	6.76 ± 0.03
6-Гидрокси-9-фенилфлуорон	3.10 ± 0.02	6.28 ± 0.06	—
Этилфлуоресцеин	2.94 ± 0.07	6.31 ± 0.03	—
Флуоресцеин-изотиоцианат ^a	1.97 ± 0.03	4.43 ± 0.02	6.87 ± 0.01
Тиофлуоресцеин	1.99 ± 0.04	4.71 ± 0.01	6.59 ± 0.01
2,7-Дихлорфлуоресцеин	0.35 ± 0.05	4.00 ± 0.10	5.19 ± 0.06
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	-0.29 ± 0.06 ^b	3.65 ± 0.05	6.55 ± 0.02
2,4,5,7-Тетрабромфлуоресцеин (эозин)	-2.0 ± 0.1 ^b	2.81 ± 0.06	3.75 ± 0.09
Этилэозин	—	$1.88-1.91$ ^b	—
Родамин Б	3.22 ± 0.02	—	—
N,N-Диэтилродол	3.08 ± 0.12	5.83 ± 0.01	—
Фенолфталеин	-5.32 ± 0.05 ^b	8.97 ± 0.08	9.73 ± 0.10

^a Изомер I. ^b В шкале функции кислотности H_0 . ^b Значение получено экстраполяцией линейной зависимости pK_{a1} от ε^{-1} в системах вода – этанол и вода – ацетон [243].

Значения $\lambda_{\max}(R^{2-})$ в водных растворах солей флуоресцеиновых красителей, как было показано еще в 1892 году Вильгельмом Оствальдом [264], не зависят от типа противоиона (NH_4^+ , K^+ , Co^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). В то время этот факт рассматривался как доказательство полноты диссоциации солей на ионы; в разбавленных водных растворах это действительно наиболее вероятное состояние, но в органических растворителях с низкими значениями диэлектрической проницаемости, где соли практически не диссоциированы, положение полос поглощения в большинстве случаев также мало зависит от типа противоиона. Впрочем, интересы В. Оствальда были сосредоточены, как известно, главным образом на водных растворах. Вещные уравнения (5)–(7) неплохо согласуются практически со всеми литературными данными, полученными в последние годы различными авторами.

В работе З. Тамуры с соавторами [167] для флуоресцеина в фосфатных буферных растворах найдены значения: $pK_{a0} = 2.24$, $pK_{a1} = 4.20$ и $pK_{a2} = 6.39$. По нашим данным, при $I = 0.2$ М {ур. (5-7) [262,263]}: соответственно 2.30, 4.25 и 6.40.

С. Смит и В. Преториус [171] подробно исследовали зависимость констант диссоциации флуоресцеина в воде от ионной силы ($I = 0.022-0.074$ М) при 5 °C и 21 °C. Они также сопоставили найденные ими для 25 °C термодинамические значения $pK_{a0} = 2.22$, $pK_{a1} = 4.34$ и $pK_{a2} = 6.68$ [$\pm (0.03-0.10)$] с данными других авторов.

Из других сравнительно новых публикаций можно отметить еще серию работ, посвященных превращениям флуоресцеина в воде и в водно-солевых растворах [153-158]. Многие количественные характеристики, найденные в этих работах, неплохо согласуются с опубликованными нами ранее. Так, в работах Х. Диля с соавторами значения $pK_{a0} = 2.13$, $pK_{a1} = 4.44$ и $pK_{a2} = 6.36$ ($I = 0.1$ М) были найдены методами растворимости и потенциометрии [153,154]. Интересно, что метод растворимости с использованием «желтой» (т.е. цвиттерионной, структура II) и «красной» (т.е. хиноидной, структура III) нейтральных форм флуоресцеина дал практически одинаковые значения pK_{a0} и pK_{a1} , но существенно разные значения растворимости ($3.8 \cdot 10^{-4}$ М и $1.45 \cdot 10^{-4}$ М, соответственно) [153]. Обработка экспериментальных данных Х. Диля, проведенная Ю. В. Холиным по программе SOLEX [265], дала значения растворимости $3.47 \cdot 10^{-4}$ М для «желтого» и $1.29 \cdot 10^{-4}$ М для «красного» флуоресцеина, а также значения $pK_{a0} = 2.28 \pm 0.13$, $pK_{a1} = 4.47 \pm 0.13$ и $pK_{a0} = 2.19 \pm 0.03$, $pK_{a1} = 4.46 \pm 0.15$, соответственно [243]. Кроме того, из этих же данных удалось получить ориентировочные оценки pK_{a2} : 6.4 ± 0.6 и 6.5 ± 0.7 , соответственно [243]. Но не все эти экспериментальные данные являются равновесными, так как в состоянии равновесия с насыщенным раствором может быть только одна и та же твердая фаза.

Применение потенциометрического метода определения констант диссоциации к водным растворам флуоресцеина ограничено малой растворимостью нейтральной формы H_2R ; имеющиеся оценки $pK_{a1} = 3-4$, $pK_{a2} = 5.9$ [75] и $pK_{a1} = 5.1$, $pK_{a2} = 6.7$ [266], вероятно, менее точны, чем результаты Х. Диля [154].

Значения $pK_{a0} = 2.18$, $pK_{a1} = 4.40$ и $pK_{a2} = 6.36$ ($I = 0.1$ М) были определены Х. Дилем с сотрудниками методом спектрофотометрии [155]. При этом при использовании в качестве рабочей длины волны 437 нм были получены следующие значения $10^{-3} \cdot E$ соответственно для H_3R^+ , H_2R , HR^- и R^{2-} : 49.4, 12.05, 21.6 и 7.61. Используя данные Х. Диля, Н. Клонис и В. Сэвайер вычислили следующие значения: $pK_{a0} = 2.26$, $pK_{a1} = 4.32$ и $pK_{a2} = 6.50$ [169].

Обработка этих же экспериментальных данных [155] по программе SOLEX позволила Ю. В. Холину получить значения $pK_{a0} = 2.19 \pm 0.03$, $pK_{a1} = 4.39 \pm 0.08$, $pK_{a2} = 6.30 \pm 0.04$ и значения $10^{-3} \cdot E$ соответственно для H_3R^+ , H_2R , HR^- и R^{2-} : 49.4, 11.6, 22.0 и 7.61 [243]. Расчеты, проведенные М. И. Рубцовым и Л. Л. Лукачкой по программе CLINP [267], привели к значениям $pK_{a0} = 2.25 \pm 0.08$, $pK_{a1} = 4.23 \pm 0.08$, $pK_{a2} = 6.31 \pm 0.05$ и значениям $10^{-3} \cdot E$ соответственно для H_3R^+ , H_2R , HR^- и R^{2-} : 49.4, 10.9, 21.6 и 7.81 [243].

Ранее нами были опубликованы данные при той же ионной силе: $pK_{a0} = 2.27 \pm 0.01$, $pK_{a1} = 4.32 \pm 0.01$, $pK_{a2} = 6.50 \pm 0.01$ [245]. Эти результаты были получены обработкой зависимости E при 449 нм от pH ($I = 0.1$ М (NaCl + буферный раствор), 25 °С) методом подбора параметра, обсужденным в свое время в литературе [240,244]. При этом одновременно со значениями pK_a получены следующие значения $10^{-3} \cdot E$ на длине волны 449 нм: 38.0 ± 0.2 , 9.7 ± 0.2 , 34.0 ± 0.2 и 15.9 ± 0.2 соответственно для H_3R^+ , H_2R , HR^- и R^{2-} . Обработка тех же экспериментальных данных по программе SOLEX, проведенная Ю. В. Холиным, привела к значениям $pK_{a0} = 2.29 \pm 0.01$, $pK_{a1} = 4.30 \pm 0.02$, $pK_{a2} = 6.53 \pm 0.03$ и $10^{-3} \cdot E$ соответственно для H_3R^+ , H_2R , HR^- : 38.1 ± 0.6 , 8.9 ± 0.4 и 33.3 ± 1.0 [243].

Кроме того, в работах Х. Диля [156] приводятся значения E_{\max} различных форм флуоресцеина, несколько заниженные по сравнению с нашими данными (табл. 2). Значения λ_{\max} , нм ($10^{-3} \cdot E_{\max}$, л моль $^{-1}$ см $^{-1}$) равны: 437 (49.8) для H_3R^+ , 437 (11.6) и 455 (5.54) для H_2R , 455 (29.3) и 475 (28.9) для HR^- и 490 (78.9) для R^{2-} .

Несколько заниженное значение E_{\max} для дианиона R^{2-} флуоресцеина в водно-щелочном растворе ($76.9 \cdot 10^{-3}$) было опубликовано и в другой работе [168], в то время как для препаратов флуоресцеина, очищенных хроматографическими методами, значения λ_{\max} ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$) дианиона R^{2-} составили 490 (88.0) [13] и 490 (90.0) [268].

Полученные нами значения максимумов полос поглощения и коэффициенты молярного поглощения различных ионных и молекулярной форм представлены в таблице 2, а типичные спектры – на рис. 5. В таблице 2 имеются также спектральные данные для некоторых других красителей, рассмотренных в настоящей статье.

Спектры различных форм флуоресцеина в каждом из исследованных смешанных и чистых растворителей измерялись нами непосредственно (H_3R^+ и R^{2-}) или уточнялись путем последовательных приближений (H_2R и HR^-). В этом случае использовались уравнения (8,9):

$$A_{HR^-} = A + (A - A_{H_2R})a_{H^+}K_{a1}^{-1} + (A - A_{R^{2-}})(a_{H^+})^{-1}K_{a2} \quad , \quad (8)$$

$$A_{H_2R} = A + (A - A_{H_3R^+})a_{H^+}K_{a0}^{-1} + (A - A_{HR^-})(a_{H^+})^{-1}K_{a1} \quad , \quad (9)$$

где A – поглощение при текущем значении pH.

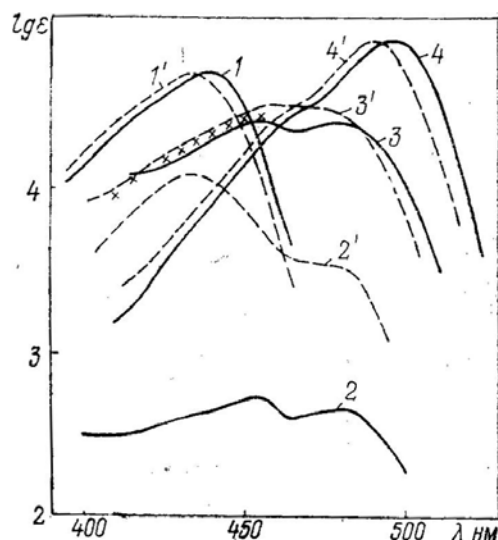


Рис. 5. Электронные спектры поглощения ионных форм флуоресцеина в 33 %-ном (по массе) водном ацетоне (1-4) и в воде (1'-4'): 1,1' – форма H_3R^+ ; 2,2' – H_2R ; 3,3' – HR^- ; 4,4' – R^{2-} [241,248].

Таблица 2. Спектральные характеристики красителей в водных растворах ^a

Соединение	λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹)			
	катион	молекула	анион	дианион
Флуоресцеин	437 (54.3)	437 (13.9); 470-485 (4-3)	454-474 (32.7-33.8)	490.5 (88.0)
Сульфифлуоресцеин	—	440 (52.2)	455; 480 (29)	495 (84)
6-Гидрокси-9-фенилфлуорон	437 (54.7) ^б	450 (31.8); 454 (32.3); 474 (32.4) ^в	491 (90.9) ^г	—
Флуоресцеин-изотиоцианат ^д	441 (54.56)	435 (24.56); 470-475 (12.9)	455 (35.0); 470 (35.2)	488 (86.5)
Тиофлуоресцеин	438 (10.8)	438 (3.5)	485 (6.0); 505 (5.6)	511 (16.7)
2,7-Дихлорфлуоресцеин	450 (44.95)	460 (8.96); 485 (8.70)	465-470 (24.1); 490 (28.3)	502 (75.02) ^е
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	455 (44.27)	450 (8.54); 455 (8.40)	465 (25.47); 490 (23.90)	509 (77.54)
Эозин	453-455 (44.5)	480-485 (8.5)	517-519 (81.9)	515 (96.7)
Эритрозин	462 (45.2)	500 (11.4)	530 (91.9)	525 (94.6)
Родамин Б	557 (108)	554 (108)	—	—
N,N-Диэтилродол	520 (22.6)	515-520 (23.5)	520 (51.5)	—
Фенолфталеин	495-500 (59)	—	—	550 (33.7)

^a Погрешность E_{\max} : $\approx 1\%$. ^б По литературным данным: 437 (52.5) [15]. ^в По литературным данным: 452 (33.3), 475 (33.0) [15]. ^г По литературным данным: 492 (90.5) [15]. ^д Изомер I. ^е По литературным данным: 507 (53.5) [133], 503 (101) [34], 502.5 (97) [268].

Для формы HR^- флуоресцеина в воде характерна довольно широкая полоса, с двойным максимумом в области 455-475 нм и с «плечом» в области 425 нм [13,28,156,168,169,209,210].

В серии работ, опубликованных польскими исследователями в 60-е годы [269-274], обнаружено изменение электронных спектров поглощения флуоресцеина во времени в водных безбуферных растворах. Хотя причина этого эффекта до конца не выяснена, можно судя по характеру изменений утверждать, что речь идет о превращении $HR^- \rightarrow R^{2-}$. На основе анализа изменений спектров флуоресцеина во времени была получена полоса иона HR^- с $\lambda_{\max} = 465$ нм и $E_{\max} = 21 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹ [273]. В то же время, в буферных растворах спектры остаются неизменными [273].

Следует отметить, что электронный спектр поглощения флуоресцеина при увеличении концентрации серной кислоты в воде не остается постоянным [243,263]. Так, значение E при 435 нм в растворах с массовой долей H_2SO_4 (54-69) % составляет $51.4 \cdot 10^3$, при увеличении содержания серной кислоты от 86.35 % до 98.5 % снижается от $48.7 \cdot 10^3$ до $31.8 \cdot 10^3$, а в 100 %-ной серной кислоте составляет $26.3 \cdot 10^3$. Предположив превращение флуоресцеина в этих условиях в катион H_4R^{2+} неустановленного строения, мы оценили значение $pK_{a(-1)} = -10.10 \pm 0.01$ в шкале H_0 [275].

В концентрированной щелочи, особенно при длительном стоянии, растворы флуоресцеина могут приобретать малиновый (фиолетовый) цвет, что связано с размыканием пиранового гетероцикла и возникновением фталеинового красителя [276].

Значения pK_a ступенчатой диссоциации в водных растворах катиона H_3R^+ 4'-иодацетамидофлуоресцеина [159] при $I \rightarrow 0$ (2.08 ± 0.03 , 4.05 ± 0.08 и 6.89 ± 0.03) за исключением значения pK_{a1} почти совпадают с термодинамическими значениями для флуоресцеина (табл. 1).

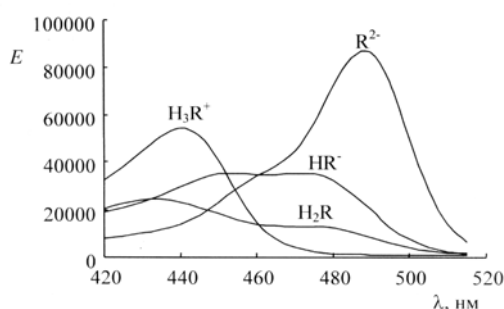


Рис. 6. Электронные спектры поглощения ионных форм флуоресцеин-изотиоцианата (изомер I) в водных растворах; $I = 0.05$ М, за исключением спектра катиона [260].

Учитывая важность широко применяемого в биохимических исследованиях производного флуоресцеина, вышеупомянутого ФИТЦ, который благодаря наличию группы NCS ковалентно связывается с макромолекулами белков, мы недавно провели специальное исследование поведения этого красителя в различных средах [260]. Результаты исследования равновесий в водном растворе представлены в таблицах 1 и 2, а спектры ионных форм ФИТЦ — на рис. 6.

Сходство протолитических свойств ФИТЦ и флуоресцеина было, конечно, ожидаемым, но в известной нам литературе значения pK_a ФИТЦ до сих пор определены не были.

Равновесия в неводных растворах. Данные о константах диссоциации в системах вода-ацетон и вода-этанол представлены в таблицах 3 и 4. Там же даны значения констант таутомерных равновесий и показателей микроконстант диссоциации флуоресцеина, о которых речь пойдет ниже. Значения констант диссоциации флуоресцеина и сульфифлуоресцеина в системах вода-диметилсульфоксид (ДМСО) и вода – 1,4-диоксан даны в таблицах 5 и 6.

Существенно, что результаты, полученные нами спектрофотометрически [286,288,289], были подтверждены другими авторами при помощи потенциометрического метода [163,164], причем в одном из наиболее трудных для определения pK_a случаев, а именно, в той области составов смеси вода – ДМСО, где $K_{a1} \approx K_{a2}$ (табл. 5).

По данным М. Шибаты с соавторами [138], значения pK_{a0} , pK_{a1} и pK_{a2} флуоресцеина в 40 %-ном 1,4-диоксане, найденные спектрофотометрически в буферных растворах, равны соответственно 1.12, 6.97 и 7.43. Эти значения не являются термодинамическими, а суммарная поправка на жидкостный потенциал и эффект среды для протона в инструментальные значения рН, по-видимому, не вносилась. По нашим данным [222], при $I = 0.05$ М $pK_{a1} = 7.08$, $pK_{a2} = 7.51$, причем в этой водно-диоксановой смеси использованные нами значения $pK_{H^+}^*$ выше инструментальных значений рН (рассчитанных по результатам градуировки цепи с переносом со стеклянным электродом по водным стандартным буферным растворам) на 0.09 ед. [220]. В этом случае совпадение результатов хорошее.

Таблица 3. Параметры протолитических равновесий флуоресцеина в системе вода-ацетон ^{а)}

Массовая доля ацетона, %	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	$\lg(K_{a0} / K_{a1})$	$\lg(K_{a1} / K_{a2})$	$K_T^{б)}$	$pK_{0,OH}$	$pK_{1,COOH}$
0	2.14	4.45	6.80	2.31	2.35	6.04	3.10	3.49
6	1.86	4.85	6.81	2.99	1.96	8.51	2.85	3.85
16.3	1.54	5.66	7.06	4.12	1.40	12.9	2.69	4.52
24.5	1.22	6.19	7.32	4.97	1.13	31.4	2.73	4.70
33.1	0.96	6.89	7.71	5.93	0.82	52	2.68	5.19
43	0.50	7.69	7.99	7.19	0.30	123	2.59	5.60
52	0.60	8.11	8.55	7.51	0.44	117	2.67	6.08
62	0.50	8.87	8.85	8.37	-0.02	238	2.88	6.54
69.1	0.42 ^{в)}	9.43	9.10	9.01	-0.33	—	—	—
73	0.42	9.95	9.41	9.47	-0.54	387	3.01	7.42
78	0.37	—	—	—	—	—	—	—
88	0.79	—	—	—	—	878	—	—
90	0.92	12.5	11.2	11.6	-1.3	1.9×10^3	4.20	9.2
91.2	1.03	—	—	—	—	—	—	—
93.2	1.17	—	—	—	—	—	—	—
93.8	1.28	—	—	—	—	—	—	—
97.2	1.92	—	—	—	—	—	—	—
97.5	2.13	—	—	—	—	2.6×10^3	—	—
98.5	2.39	—	—	—	—	—	—	—

^{а)} По данным работ [241,243,277-282], проведенных при температурах от 21 °С до 25 °С; погрешность значений pK_a в среднем ± 0.05 , а в 90%-ном ацетоне: $\pm (0.1-0.3)$; ^{б)} в воде, в 6%-ном и 16.3%-ном ацетоне значения K_T' равны соответственно 1.96, 0.617 и 0.16; ^{в)} в 68.4 %-ном ацетоне.

Таблица 4. Параметры протолитических равновесий флуоресцеина в системе вода-этанол ^{а)}

Массовая доля этанола, %	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	$\lg(K_{a0} / K_{a1})$	$\lg(K_{a1} / K_{a2})$	$K_T^{б)}$	$pK_{0,OH}$	$pK_{1,COOH}$
0	2.14	4.45	6.80	2.31	2.35	6.04	3.10	3.49
15.7	1.96	5.11	7.02	3.15	1.91	7.16	2.88	4.19
32.7	—	—	—	—	—	18.6	—	—
41.5	—	—	—	—	—	24.0	—	—
51	0.94	6.85	7.68	5.91	0.83	29.7	2.41	5.38
60.6	—	—	—	—	—	32.5	—	—
71.7	—	—	—	—	—	35.7	—	—
79.4	0.95	7.81	8.26	6.86	0.45	46.5	2.63	6.13
90.7	1.21	8.16	9.41	6.95	1.25	54.4	2.95	6.42
93	1.37	—	—	—	—	—	3.12	—
96	1.71	—	—	—	—	—	3.47	—
96.8	1.87	—	—	—	—	—	3.63	—
99.5	2.77	—	—	—	—	—	4.55	—
99.9	3.21	—	—	—	—	—	4.99	—
99.99	3.34	11.72	12.59	8.38	0.87	58.8	5.12	9.94

^{а)} По данным работ [243,283-285], проведенных при температурах от 21 °С до 25 °С; погрешность значений pK_a в среднем ± 0.05 , а в чистом этаноле: $\pm (0.07-0.18)$; ^{б)} в воде и в 15.7%-ном этаноле значения K_T' равны соответственно 1.96 и 0.175.

Таблица 5. Параметры протолитических равновесий флуоресцеина и сульфифлуоресцеина в системе вода–ДМСО [286-289] ^а

Соединение, параметр	Массовая доля ДМСО, %:					
	0	21.6	42.2	60.3	81.4	91.3
Флуоресцеин:						
pK_{a0} ^б	2.14	1.44	1.07	0.32	-0.37	-0.51
pK_{a1}	4.45	5.50	6.09	7.21	8.67	10.33
K_T ^в	6.04	8.43	35.5	104	384	587
$pK_{0,OH}$	3.10	2.41	2.52	2.34	2.21	2.26
$pK_{1,COOH}$	3.49	4.53	4.64	5.18	6.09	7.56
$pK_{a2}=pK_{2,OH}$	6.80	7.05	7.08	7.13	7.46	8.98
Сульфифлуоресцеин:						
$pK_{a2}=pK_{2,OH}$	6.76	6.83	6.90	7.12	7.64	9.04
$pK_{a1}=pK_{1Z}$	3.22	2.89	2.78	2.66	2.52	3.16
Флуоресцеин:						
$\lg(K_{a0} / K_{a1})$	2.31	4.06	5.02	6.89	9.04	10.84
$\lg(K_{a1} / K_{a2})$	2.35	1.55	0.99	-0.08	-1.21	-1.35

^а Значения pK_{a0} флуоресцеина определены с погрешностью $\pm (0.01-0.07)$, а pK_{a1} и pK_{a2} – с погрешностью $\pm (0.01-0.17)$; погрешность определения pK_{a1} и pK_{a2} сульфифлуоресцеина: соответственно $\pm (0.05-0.11)$ и $\pm (0.03-0.05)$. ^б Значения pK_{a0} флуоресцеина в 94.2 %- и 96.2 %-ном ДМСО равны соответственно -0.50 и -0.36. ^в Значения K_T в 72.0 %- , 94.2 %- и 96.2 %-ном ДМСО равны соответственно 245, 624 и 681.

Таблица 6. Параметры протолитических равновесий флуоресцеина, сульфифлуоресцеина и этилэозина в системе вода–1,4-диоксан (20 ± 2 °C, погрешность pK_a в среднем ± 0.05) [222,243,290]

Масс. доля диоксана, %	Флуоресцеин				Сульфифлуоресцеин		Этилэозин
	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	K_T	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a1}
0	2.14	4.45	6.80	6.04	3.22	6.76	1.90
20.7	1.58	5.89	6.56	20	3.25	7.13	—
40	1.01	7.26	8.04	70	3.52	7.90	2.75
60.4	—	—	—	—	—	—	3.70
64	0.78	9.45	9.53	173	4.58	9.58	4.03
70.4	—	—	—	—	—	—	≈ 4.4

Отдельные данные для флуоресцеина в водно-органических смесях, содержащих около 40 % (по массе) метанола, этанола, ацетона и 1,4-диоксана, были получены рядом авторов [88,138,145,147]; например, в 41%-ном водном 1,4-диоксане были найдены значения $pK_{a1} = 6.95$, $pK_{a2} = 8.10$ [147]. В некоторых случаях равновесия (2) и (3) рассматривались как изолированные, что в общем случае неверно. Раздельно определялись и константы диссоциации 4'-иодацетамидофлуоресцеина в водно-диоксановых смесях [159], но значения pK_{a1} и pK_{a2} , полученные этими авторами, например, в 40%-ном (по массе) 1,4-диоксане, равны 6.6 и 8.4 соответственно, а в 60 %-ном 1,4-диоксане: 8.0 и 10.1, что указывает на необходимость совокупного расчета. Но в целом литературные данные согласуются с результатами наших систематических исследований [222,241,243,277-290] в том смысле, что значения pK_{a1} и pK_{a2} флуоресцеина сближаются при переходе от воды к водно-органическим средам. К таким же выводам приводят данные систематического термодинамического исследования диссоциации флуоресцеина в системе вода – пропанол-2 [163,164]. Полученные нами зависимости значений pK_{a0} , pK_{a1} и

pK_{a2} флуоресцеина от состава смешанных растворителей даны на рисунке 7. Налицо как резкое расхождение значений pK_{a0} и pK_{a1} , так и сближение значений pK_{a1} и pK_{a2} (табл. 7).

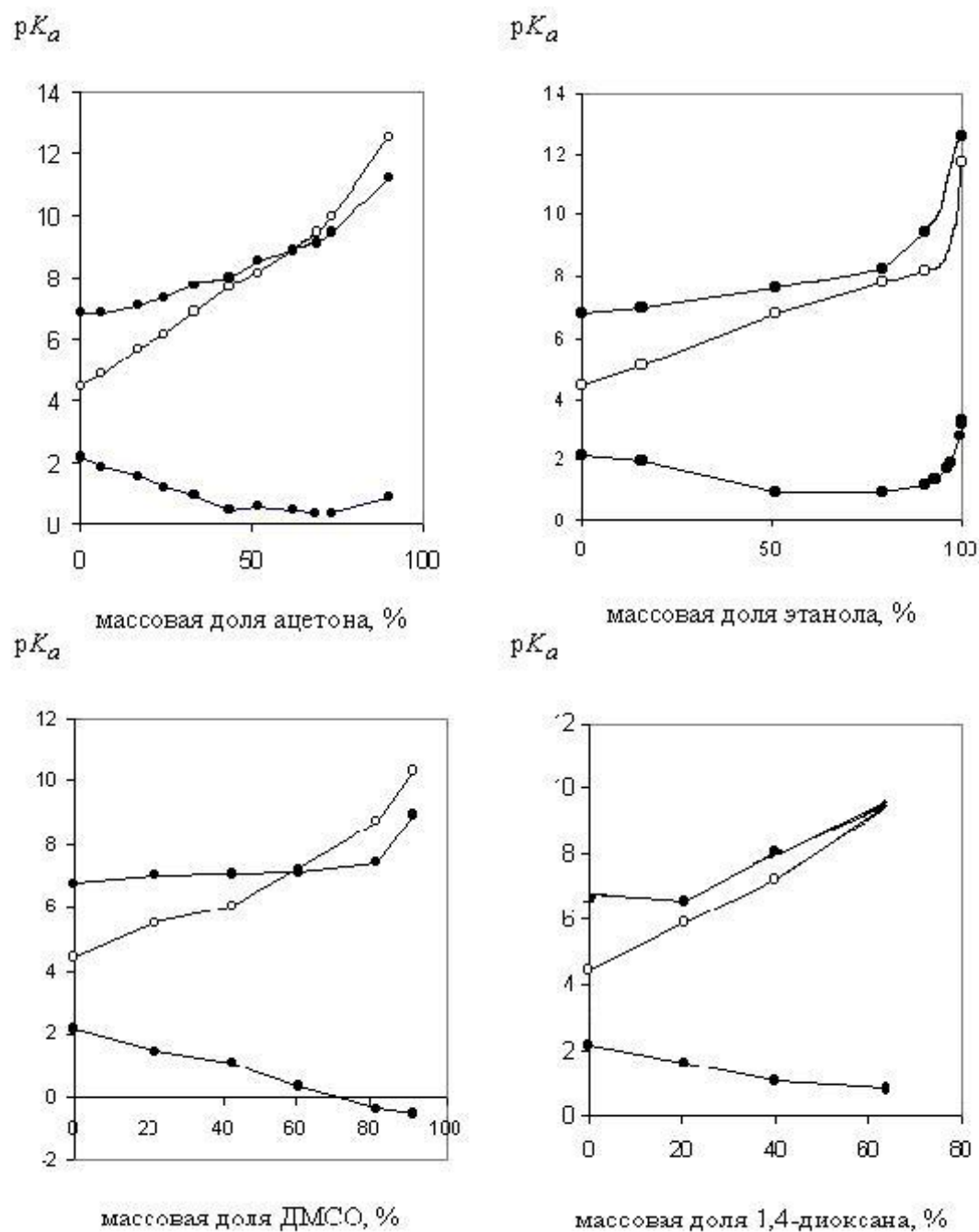


Рис. 7. Зависимости pK_a флуоресцеина от составов смешанных растворителей, по данным таблиц 3-6:
 ● — pK_{a0} и pK_{a2} , ○ — pK_{a1} .

Таблица 7. Значения pK_a , констант таутомерных равновесий и показателей микроконстант диссоциации ксантеновых соединений в различных растворителях

Соединение	константа	вода ^а	мета нол ^б	этанол ^в	91%-ный ДМСО ^г	90%-ный ацетон ^д	ДМФА ^е
Флуоресцеин	pK_{a0}	2.14	3.1	3.3	-0.51	0.92	0.3
—“—	pK_{a1}	4.45	10.6	11.7	10.33	12.5	14.6
—“—	$pK_{a2}=pk_{2,OH}$	6.80	11.5	12.6	8.98	11.2	14.8
—“—	K_{a0} / K_{a1}	204	$3 \cdot 10^7$	$2.5 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^{14}$
—“—	K_{a1} / K_{a2}	224	7.9	7.9	0.045	0.05	1.6
—“—	K_T	6.0	54	59	587	1900	1033
—“—	$pk_{0,OH}$	3.10	4.8	5.1	2.2	4.2	3.3
—“—	$pk_{1,COOH}$	3.49	8.8	9.9	7.6	9.2	11.6
—“—	$\Delta pk_{0,OH}$	—	1.7	2.0	-0.9	1.1	0.2
—“—	$\Delta pk_{1,COOH}$	—	5.3	6.4	4.1	5.7	8.1
—“—	$\Delta pk_{2,OH}$	—	4.7	5.8	2.2	4.4	8.0
Бензойная к-та	pk_{COOH}	4.20	9.4	10.25	8.05	9.75	12.3
Родамин Б	pK_{a0}	3.22	7.4	8.7	5.60	6.47	6.5
—“—	$K_T^{//}$	0.008	0.1	0.28	59	16.6	100
—“—	$pk_{\pm,COOH}$	3.22	7.5	8.8	7.4	7.7	8.5
—“—	$\Delta pk_{\pm,COOH}$	—	4.3	5.5	4.2	4.5	5.3
Эозин	pK_{a1}	2.81	6.9	7.7	3.9	6.4	7.1
—“—	$pK_{a2}=pk_{2,COOH}$	3.75	9.2	9.8	7.81	10.0	12.4
—“—	K_{a1} / K_{a2}	8.7	200	126	$8 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^5$
—“—	K_T	1.8	6.4	10	9.0	16.5	15
—“—	$pk_{1,OH}$	2.4	6.0	6.7	2.9	5.2	5.9
—“—	$\Delta pk_{1,OH}$	—	3.6	4.3	0.5	2.8	3.5
—“—	$\Delta pk_{2,COOH}$	—	5.4	6.2	4.1	6.25	8.6
$\varepsilon =$		78	32	25	56	24	37

^а По данным работ [246,248,251,291-293]. ^б По данным работы [242]. ^в По данным работы [285]. ^г По данным работ [286-289,294]. ^д По данным работ [243,279-282,295]. ^е По данным работы [296].

Резкое уменьшение предельного выхода формы HR^- в неводном растворе по сравнению с водным иллюстрируют диаграммы Бьеррума (рис. 8). Как будет показано далее, этот эффект находит свое объяснение с учетом как природы диссоциирующих функциональных групп, так и существенного сдвига положения таутомерного равновесия нейтральной формы H_2R .

Спектры иона R^{2-} флуоресцеина подвержены влиянию природы растворителя [16,175,202,296], однако изменения не выходят за пределы обычных сольватационных эффектов (рис. 9).

Наличие лишь одного электронного перехода в спектре поглощения в области длинноволновой полосы ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход) считается общепризнанным [16,236,237,297] и подтверждается результатами квантово-химических расчетов [20,213]. Коротковолновое плечо, обусловленное наличием колебательных подуровней, заметно проступает по сравнению со спектром в воде особенно в апротонных (не являющихся донорами водородных связей) органических растворителях. Такая картина, типичная для форм R^{2-} эозина, эритрозина и других гидроксиксантенов,

может объясняться тем, что образование водородных связей в воде приводит к дальнейшему расщеплению колебательных подуровней.

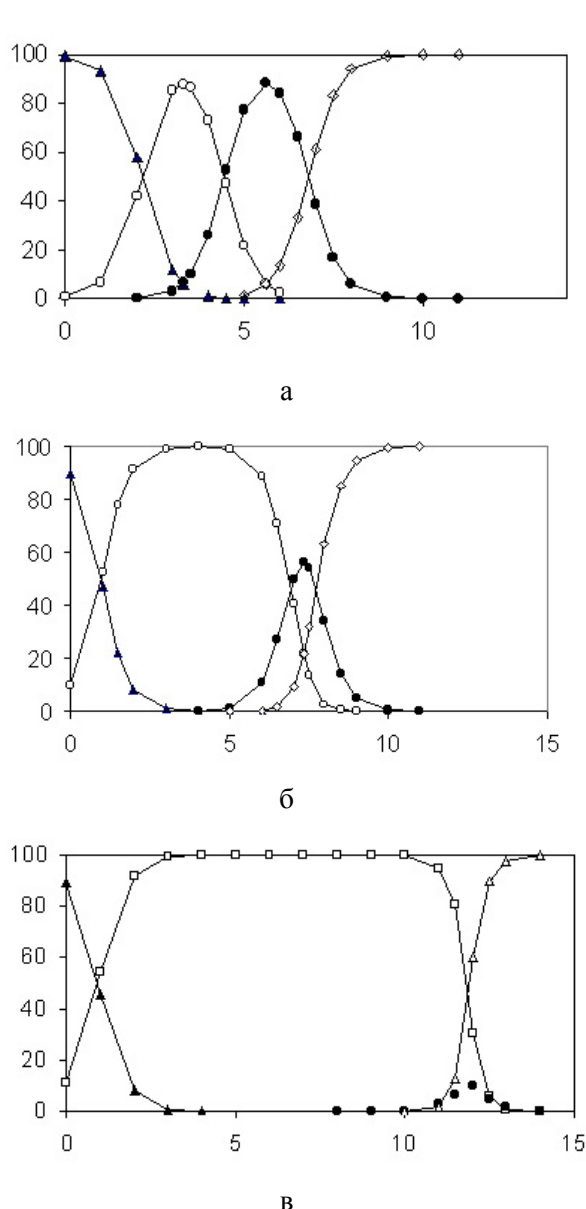


Рис. 8. Долевое распределение ионных (\blacktriangle – H_3R^+ ; \bullet – HR^- ; Δ – R^{2-}) и молекулярной (\square – H_2R) форм флуоресцеина: а) в воде, б) в 33%-ном водном ацетоне, в) в 90 %-ном водном ацетоне; в расчетах использованы термодинамические значения pK_a .

лярным апротонным растворителям наблюдается гиперхромный эффект, так, в ДМФА нами получено: $E_{\max} = 116 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$; $\lambda_{\max} = 520.5 \text{ нм}$ [296], что согласуется с данными других авторов [16]. По некоторым данным [213], в ацетонитриле интенсивность поглощения дианиона флуоресцеина R^{2-} (VII) в максимуме полосы (λ_{\max}) очень мала: значение E_{\max} – всего $5.5 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Вероятно, причина в неполном превращении красителя в дианион по причине присутствия кислых примесей в растворителе в условиях измерений [213]. При достаточно высоком значении $pa_{H^+}^*$, в условиях полного превращения флуоресцеина в дианион R^{2-} (VII),

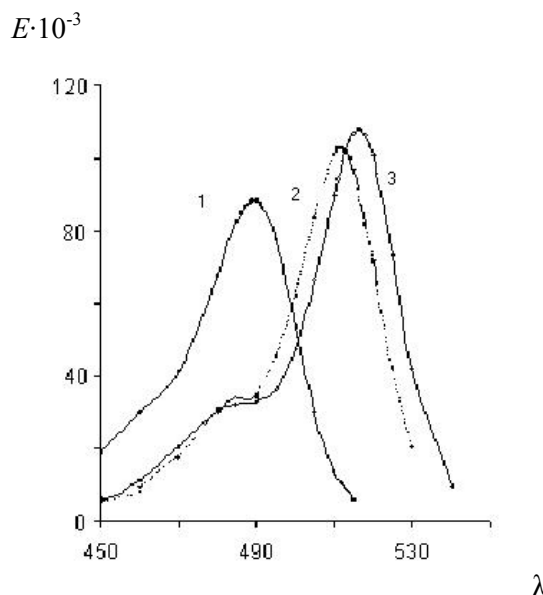


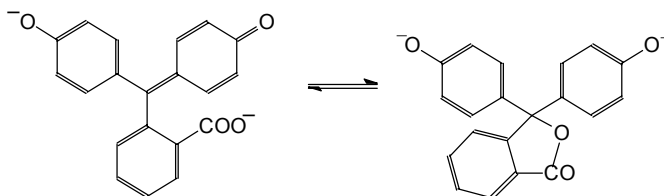
Рис. 9. Спектры поглощения формы R^{2-} флуоресцеина: 1 – в воде с добавкой NaOH; 2 – в ацетонитриле с добавкой KOH и дициклогексил-18-краун-6; 3 – в N,N -диметилформамиде с добавкой KOH и 18-краун-6 [296].

В некоторых растворителях, например, в ацетонитриле, спектры дианиона флуоресцеина довольно чувствительны к малым добавкам воды [202]. Разумеется, все опыты подобного рода следует проводить в условиях, обеспечивающих полное превращение красителя в ион R^{2-} .

Во всех растворителях дианион флуоресцеина R^{2-} (VII) характеризуется высоким значением коэффициента молярного поглощения (E_{\max}) – порядка $10^5 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Так, в воде $E_{\max} = (88.0 \pm 0.7) \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ($\lambda_{\max} = 490\text{-}491 \text{ нм}$); в n -бутаноле: $E_{\max} = 94 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$; $\lambda_{\max} = 505 \text{ нм}$. Сходные результаты имеются и для других растворителей; при переходе от воды к спиртам и далее к по-

полоса поглощения в ацетонитриле имеет высокую интенсивность: при $\lambda_{\max} = 512$ нм $E_{\max} = 103 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹ [296].

Существенного изменения интенсивности длинноволновой полосы поглощения дианиона при варьировании состава растворителя не наблюдалось, что позволяет не считаться с возможностью появления в растворах дианиона-лактона. Такое таутомерное равновесие типично для фенолфталеина [253,298-302]:



В самом деле, в воде, метаноле и в ДМСО значения $E_{\max} (R^{2-})$ составляют соответственно $33.7 \cdot 10^3$, $2.44 \cdot 10^3$ и $115 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹ [253,300,301]. Последнее значение, опубликованное И. Кольцгофом с сотрудниками [300], было недавно подтверждено в нашей лаборатории измерениями Н. А. Водолазкой. В воде значение константы равновесия по нашим оценкам равно 0.9, а в этиловом и метиловом спиртах составляет соответственно 5.2 и 25 [301]. Среди гидроксиксантовых красителей подвижность таутомерного равновесия дианиона отчетливо проявляется для некоторых нитропроизводных флуоресцеина, о которых речь еще пойдет ниже.

3. Детальная схема диссоциации флуоресцеина

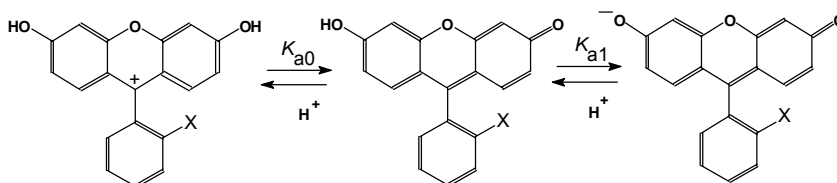
Оценка констант таутомерных равновесий. Основной задачей предыдущего раздела было изложение результатов определения констант диссоциации и спектральных характеристик флуоресцеина. Вместе с тем, правильное отнесение значений pK_a требует обоснованной оценки долей тех или иных таутомеров от общей концентрации соответствующих молекул и ионов.

Исследование таутомерии гидроксиксантовых красителей как в воде [13,28,34,126,166-169], так и в неводных средах [25,49,50,117-123,138,145,146,159-161] проводилось прежде всего и главным образом методом электронной спектроскопии.

Основным экстратермодинамическим допущением, необходимым для идентификации различных структур (схема 1) при помощи спектров поглощения в видимой области, является предположение о незначительности влияния диссоциации карбоксильной группы в положении 2' ($\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^-$) на длинноволновую полосу поглощения красителя, что позволило моделировать спектры частиц типа II и III спектрами частиц I и V соответствующего красителя. Это, с учетом бесцветности лактонов IV, обусловленной sp^3 – гибридизацией центрального (узлого) атома углерода, позволило рассчитать доли таутомеров II, III и IV, а следовательно и константы таутомерных равновесий.

Обоснованность этих допущений подтверждается данными об электронных спектрах ряда простых и сложных эфиров флуоресцеина, эозина и других гидроксиксантовых, содержащими как в наших цитированных выше работах, так и в публикациях других авторов [49-51,117,126,161,203,303].

Например, на рисунке 10 представлены типичные примеры спектров ионных и молекулярных форм модельных соединений 6-гидрокси-9-фенилфлуорона ($X = \text{H}$) и сульфофлуоресцеина ($X = \text{SO}_3^-$):



Эти и многие другие данные такого же рода показывают, что наличие отрицательно заряженной карбоксилатной группировки в положении 2' приводит к небольшому гипсохромному сдвигу полосы поглощения катионного и особенно анионного ксантенового хромофора. Например, bathochромный сдвиг полосы R^- 6-гидрокси-9-фенилфлуорона относительно полосы R^{2-} флуоресцеина составляет 5 нм в бутаноле-1, 6 нм в 64%-ном 1,4-диоксане, 7 нм – в этаноле и в 91 %-ном водном ДМСО. Группа SO_3^- такого влияния не оказывает, и значение λ_{max} дианиона R^{2-} сульфифлуоресцеина в различных растворителях практически совпадает со значением λ_{max} моноаниона R^- этилфлуоресцеина или 6-гидрокси-9-фенилфлуорона, а в воде даже на 4 нм выше. Причина, возможно, заключается в высоком эффективном положительном заряде на атоме серы.

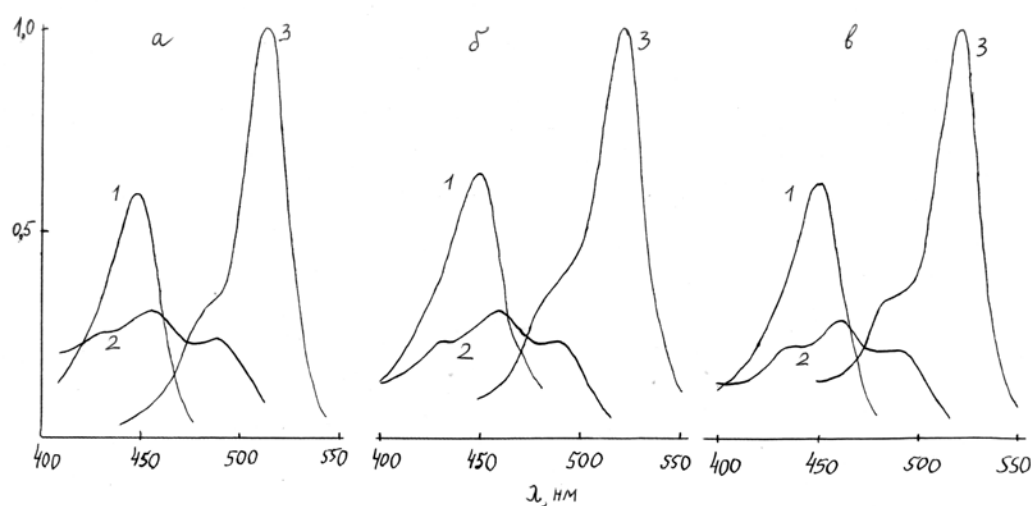
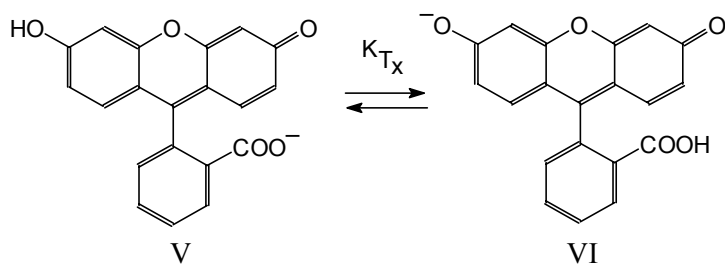


Рис. 10. Спектры поглощения ионных и молекулярных форм флуоресцеина (а), сульфифлуоресцеина (б) и 6-гидрокси-9-фенилфлуорона (в) в 91 %-ном (по массе) водном ДМСО; (а): 1 – H_3R^+ ; 2 – HR^- ; 3 – R^{2-} ; (б): 1 – H_2R ; 2 – HR^- ; 3 – R^{2-} ; (в): 1 – H_2R^+ ; 2 – HR ; 3 – R^- [243,288]. Спектры нормированы по максимуму длинноволновой полосы.

Вопрос о влиянии отрицательного заряда в положении 2' на положение максимума длинноволновой полосы поглощения дианиона VII флуоресцеина был рассмотрен нами совместно с В. В. Ивановым в работе, готовящейся в настоящее время к публикации. В различных растворителях были оценены значения максимумов полос структуры VII и аниона 6-гидрокси-9-фенилфлуорона, отличающегося от структуры VI наличием атома водорода вместо группы $COOH$. В квантово-химических расчетах, проведенных В. В. Ивановым, сольватационные эффекты описывались в рамках поляризационно-континуальной модели (*polarizable Continuum model*, PCM). Был использован один из вариантов учета влияния среды по Кирквуду, описанный ранее А. В. Лузановым и В. В. Ивановым [304]. При этом предполагается сферически симметричная полость, погруженная в диэлектрическую среду. Были получены результаты для воды, метанола, этанола и ДМФА. Хотя расхождения между рассчитанными и экспериментальными значениями варьируют от +6 до –23 нм, но полоса аниона 6-гидрокси-9-фенилфлуорона всегда оказывается смещенной в красную область по сравнению с полосой иона VII флуоресцеина, причем величина смещения растет при переходе от воды к неводным растворителям. Таким образом, многократно отмечавшийся экспериментальный факт [16] получил полуколичественное теоретическое подтверждение.

Принципиальный вопрос о существовании в тех или иных растворителях таутомера VI незамещенного флуоресцеина [218] сводится к тому, наблюдается ли при какой-либо кислотности полоса поглощения с λ_{max} больше, чем у дианиона R^{2-} .



Такая полоса явилась бы доказательством появления таутомера VI, но в случае незамещенного флуоресцеина она не наблюдалась ни в одном из исследованных нами растворителей самой различной природы [222,241,243,245,248,249,277-289,296]. Таким образом, становится очевидным, что моноанион HR^- в случае флуоресцеина диссоциирован по карбоксильной группе (структура V), и константа K_{Tx} является малой величиной.

С другой стороны, исключительное сходство спектра формы HR^- флуоресцеина (рис. 10) со спектрами нейтральных форм HR 6-гидрокси-9-фенилфлуорона и этилфлуоресцеина, а также иона HR^- сульфофлуоресцеина (последний, естественно, диссоциирован по сульфонатной группе) позволяет утверждать, что доминирующим таутомером в случае флуоресцеина является структура V.

Для коэффициента молярного поглощения нейтральной формы при фиксированной длине волны можно с учетом бесцветности лактона IV записать:

$$E_{II}\alpha_{II} + E_{III}\alpha_{III} = E(H_2R), \quad (10)$$

$$\alpha_{II} + \alpha_{III} + \alpha_{IV} = 1. \quad (11)$$

Здесь α_{II} , α_{III} и α_{IV} – доли соответствующих таутомеров от общей концентрации нейтральной формы H_2R . $K_T = \alpha_{IV}/\alpha_{III}$; $K'_T = \alpha_{II}/\alpha_{III}$. Для оценки долей таутомеров нейтральной формы флуоресцеина в воде значения коэффициентов молярного поглощения таутомеров II и III при данной длине волны приравнивали соответствующим значениям для ионов H_3R^+ и HR^- . В результате получены следующие значения: $\alpha_{II} = 0.218$, $\alpha_{III} = 0.111$, $\alpha_{IV} = 0.671$; отсюда: $K_T = 6.04$, $K'_T = 1.96$; $K''_T = 3.08$ [248].

Микроконстанты диссоциации. Константы K_a являются брутто-константами, и в общем случае их нельзя отнести к той или иной функциональной группе. Для осуществления такого отнесения необходимо располагать значениями констант «частных» протолитических равновесий, или микроконстант диссоциации, k . Связь значений K_a , констант таутомерных равновесий и микроконстант диссоциации дается уравнениями, вытекающими из схемы 1:

$$pK_{a0} = pk_{0,OH} - \lg(1 + K_T + K'_T) = pk_{\pm,COOH} - \lg\{1 + K''_T + (K'_T)^{-1}\}; \quad (12)$$

$$\begin{aligned} pK_{a1} &= pk_{1,COOH} + \lg(1 + K_T + K'_T) - \lg(1 + K_{Tx}) = \\ &= pk_{1Z} + \lg\{1 + K''_T + (K'_T)^{-1}\} - \lg(1 + K_{Tx}) = \\ &= pk_{1,OH} + \lg(1 + K_T + K'_T) - \lg(1 + K_{Tx}^{-1}); \end{aligned} \quad (13)$$

$$pK_{a2} = pk_{2,COOH} + \lg(1 + K_{Tx}^{-1}) = pk_{2,OH} + \lg(1 + K_{Tx}). \quad (14)$$

Эти уравнения позволяют оценить значения микроконстант k как в воде, так и в неводных растворителях, и таким образом получить зависимость их от природы растворителя (или состава смешанного растворителя). Для флуоресцеина, с учетом практического отсутствия таутомера VI, соотношения упрощаются:

$$pK_{a0} = pk_{0,OH} - \lg(1 + K_T + K'_T) = pk_{\pm,COOH} - \lg\{1 + K''_T + (K'_T)^{-1}\}; \quad (15)$$

$$\begin{aligned} pK_{a1} &= pk_{1,COOH} + \lg(1 + K_T + K'_T) \\ &= pk_{1Z} + \lg\{1 + K''_T + (K'_T)^{-1}\}; \end{aligned} \quad (16)$$

$$pK_{a2} = pk_{2,OH}. \quad (17)$$

В частности, уравнения (15)-(17) позволяют рассчитать показатели микроконстант диссоциации флуоресцеина в водном растворе: $pk_{\pm,COOH} = 2.80$; $pk_{0,OH} = 3.10$; $pk_{1,Z} = 3.79$; $pk_{1,COOH} = 3.49$; $pk_{2,OH} = 6.80$ [248].

Значение $pk_{1,COOH}$ флуоресцеина совпадает со значением pK_a *o*-фенилбензойной кислоты (3.46) [305]. Это отражает характер влияния объемистого *орто*-заместителя на диссоциацию карбоксильной группы.

Значения pk , отвечающие диссоциации гидроксигрупп, необходимо сопоставить со значениями pK_a других ксантовых соединений, которые можно рассматривать в качестве модельных (табл. 1). Значение pK_{a2} ($= pk_{2,OH}$) флуоресцеина в водном растворе (6.80) практически совпадает с соответствующим значением для сульфифлуоресцеина (6.76), что вполне естественно, так как речь идет о диссоциации гидроксигрупп идентичных ксантовых фрагментов (см. выше).

Значение $pk_{0,OH}$ флуоресцеина (3.10) совпадает со значением pK_{a0} 6-гидрокси-9-фенилфлуорона (3.10) и достаточно близко к значению pK_{a0} этилфлуоресцеина (2.94). В то же время, значения pK_{a1} 6-гидрокси-9-фенилфлуорона и этилфлуоресцеина в воде на 0.5 ед. ниже значений pK_{a2} флуоресцеина и сульфифлуоресцеина. Как известно, наличие отрицательного заряда в анионе двухосновной кислоты затрудняет отщепление второго протона с образованием двухзарядного аниона. Эффект описывается уравнением Бьеррума – Кирквуда – Вестхаймера [306,307]:

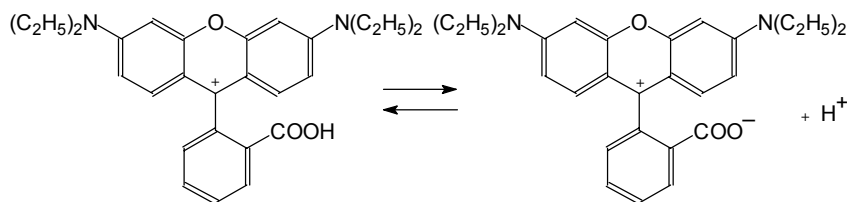
$$\delta pK_a = \frac{e^2 N_A}{2.302 RT \times 4\pi \times 8.854 \times 10^{-12}} \times \frac{1}{\epsilon_{eff} r} = \frac{24.3}{\epsilon_{eff} r} \quad (18)$$

где δpK_a – разность между значениями pK_a двух кислот – содержащих и не содержащих дополнительную отрицательно заряженную группу, ϵ_{eff} – эффективная диэлектрическая проницаемость, r – расстояние между заряженной и диссоциирующей группами (в нм); $T = 298.15$ К. Эффекты подобного рода особенно подробно рассмотрены А. Н. Верещагиным [307].

Это обуславливает различие значения pK_{a2} флуоресцеина (6.80) с одной стороны и значений pK_{a1} 6-гидрокси-9-фенилфлуорона (6.28) и этилфлуоресцеина (6.31) – с другой. По той же причине значение $pk_{\pm,COOH}$ флуоресцеина (2.80) существенно ниже значения $pk_{1,COOH}$ того же соединения (3.49).

Труднее объяснить тот факт, что сильно различаются значения $pk_{1,Z}$ флуоресцеина (3.79) и pK_{a1} сульфифлуоресцеина (3.22). Это может быть обусловлено особенностями влияния атома серы сульфонатной группировки на характер распределения электронной плотности в ксантовом фрагменте, несущем положительный заряд. Во всяком случае, данный эффект ждет более детального обсуждения.

Сведения о диссоциации родамина Б в растворах (табл. 1) могут быть использованы для сопоставления со значением $pk_{\pm,COOH}$ флуоресцеина. В водных растворах доля лактонной структуры пренебрежимо мала, и значение pK_{a0} родамина Б (3.22) совпадает по смыслу со значением $pk_{\pm,COOH}$:



Здесь, очевидно, проявляются более сильные электронодонорные свойства диэтиламиногрупп по сравнению с гидроксигруппами: эффективный положительный заряд на центральном атоме углерода в случае карбокатиона флуоресцеина выше, чем в случае родамина Б, и это об-

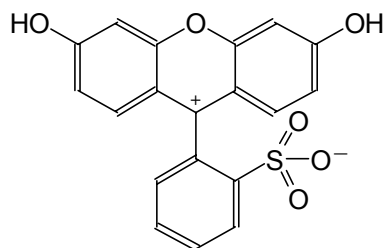
легчает диссоциацию карбоксильной группы. Хотя сопряжение между ксантеновым циклом и остатком фталевой кислоты ввиду почти перпендикулярного расположения этих фрагментов отсутствует, влияние осуществляется по индукционному эффекту. В воде спектры форм HR^+ и R родамина Б очень сходны: при практически одинаковой интенсивности полоса катиона смещена относительно полосы нейтральной формы в красную область всего на 2-3 нм. Протонирование атомов азота происходит в гораздо более кислой области [243,246,292,293].

В неводных растворителях нейтральная форма родамина Б может в заметной степени превращаться в бесцветный лактон, константа K_T'' таутомерного равновесия (цвиттерион \rightleftharpoons лактон) оценивается путем приравнивания значения E_{\max} цвиттериона соответствующему значению для катиона в том же растворителе, а значение $pK_{\pm, \text{COOH}}$ вычисляется из значений pK_{a0} и K_T'' [242,243,256,285,287,290-294,296,308]. Следует, однако, отметить, что в растворителях, не являющихся донорами водородных связей, конфигурации полос поглощения R и HR^+ уже не так похожи, как в воде и в спиртах, и точные количественные оценки положения таутомерного равновесия затруднены [287,293,294,296].

Для флуоресцеина в неводных растворителях необходимо было прежде всего оценить значения K_T и K_T' , а затем и все значения pK флуоресцеина в неводных растворителях. Отдельные примеры значений констант таутомерных равновесий и микроконстант диссоциации в неводных (водно-органических) растворителях представлены в таблицах 3-5 и 7.

И в этих условиях данные для модельных соединений играют существенную роль в подтверждении правильности интерпретации детальной схемы равновесий гидроксиксантенов. Так, значения pK_{a0} 6-гидрокси-9-фенилфлуорона, этилфлуоресцеина и *n*-децилфлуоресцеина в различных растворителях близки к значениям $pK_{0, \text{OH}}$ флуоресцеина, а значения pK_{a1} этих красителей ниже значения pK_{a2} флуоресцеина, в соответствии с ур. (18).

В случае сульфифлуоресцеина ($\text{X} = \text{SO}_3^-$) изображенные выше ступени диссоциации описываются константами K_{a1} и K_{a2} ; протонирование сульфонатной группировки может происходить в достаточно кислых средах, образования же сульфонной структуры не наблюдалось ни в одном из исследованных растворителей, в то время как лактонные циклы в случае флуоресцеина, его галогенпроизводных и родамина Б замыкаются достаточно легко. В противоположность сульфифлуоресцеину, в случае сульфифталейнов сультоны в ацетоне, ацетонитриле и во многих других растворителях образуются сравнительно легко [299,309,310]. Нейтральная форма сульфифлуоресцеина существует исключительно в виде цвиттериона:



В неводных средах с более низким, чем у воды, значением ϵ , эффекты, предсказываемые уравнением (18), усиливаются, так изменения макроскопического значения ϵ и значения ϵ_{eff} симбатны. В качестве примера рассмотрим данные, полученные в 82%-ном водном *n*-бутаноле [311]. В частности, значения pK гидроксигрупп ксантеновых красителей заметно выше в том случае, когда в положении 2' имеется отрицательно заряженная группа, что доказывается сравнением значений $pK_{0, \text{OH}} = 2.7$ (флуоресцеин, этилфлуоресцеин) и $pK_{1, \text{Z}} = 4.4$ (сульфифлуоресцеин), а также значений $pK_{1, \text{OH}} = 8.4$ (этилфлуоресцеин) и $pK_{2, \text{OH}} = 9.5-9.6$ (флуоресцеин, сульфифлуоресцеин). Аналогично этому, на кислотную силу карбоксильной группы в положении 2' оказывает влияние заряд (положительный или отрицательный) ксантенового ядра: $pK_{\pm, \text{COOH}} = 5.6$ (родамин Б), $pK_{1, \text{COOH}} = 7.0$ (флуоресцеин) и $pK_{2, \text{COOH}} = 8.3$ (эозин). Данные для эозина, приводимые в таблице 7, будут подробнее обсуждены несколько позже.

Анализ литературных данных. Размеры статьи не позволяют подробно рассмотреть все публикации, в которых затрагивается проблема таутомерии флуоресцеина. Кратко упомянем лишь некоторые работы последних лет.

З. Тамура с соавторами [167], исследуя при помощи спектрофотометрического метода равновесия флуоресцеина в водных 0.2 М фосфатных буферных растворах, приводит следующие значения долей таутомеров: $\alpha_{II} = 0.20$, $\alpha_{III} = 0.13$, $\alpha_{IV} = 0.67$. Это удивительно хорошо совпадает с опубликованными нами на пятнадцать лет раньше [248] значениями $\alpha_{II} = 0.22$, $\alpha_{III} = 0.11$, $\alpha_{IV} = 0.67$ (нелишним будет отметить тот факт, что в момент публикации нашей работы [248] З. Тамура с соавторами еще придерживались той точки зрения, что нейтральная форма флуоресцеина в воде представлена исключительно лактонным таутомером IV [126]). При этом в цитированной работе [167] спектры таутомеров II и III моделируются спектрами ионов I и V, соответственно, а также сопоставляются константы диссоциации флуоресцеина и сульфифлуоресцеина, но отсутствуют ссылки на публикации, в которых такой подход уже был использован ранее [13,222,242,254,257,289]. Значения $pK_{a1} = 3.10$ и $pK_{a2} = 6.25$, найденные З. Тамурой с соавторами для сульфифлуоресцеина в фосфатных буферных растворах указанной концентрации, с учетом типов зарядов кислотно-основных пар неплохо согласуются с термодинамическими значениями $pK_{a1} = 3.10$ и $pK_{a2} = 6.76$, опубликованными нами ранее [254,289]. К сожалению, в обсуждаемой работе вообще мало ссылок на предыдущие исследования; в частности, отсутствует ссылка на обстоятельное исследование другой группы японских авторов [138], и тем более нет сопоставления своих результатов с выводами, сделанными в этой важной работе.

В свете общей схемы равновесий (схема 1) становится очевидной недостаточность представлений, развиваемых рядом авторов. Утверждая, что нейтральная форма флуоресцеина в водных растворах существует исключительно в виде цвиттериона (II) и относя значения $pK_{a0} = 2.13$, $pK_{a1} = 4.44$ и $pK_{a2} = 6.36$ ($I = 0.1$ М) к группам COOH, OH и OH соответственно, Х. Диль с сотрудниками предполагают, что аномальное усиление кислотности карбоксильной группы обусловлено высоким эффективным положительным зарядом на гетероатоме кислорода [154]. Однако в этом случае трудно объяснить, почему значение pK_{a0} в воде на единицу ниже аналогичной константы для родамина Б (3.22), у которого в воде эта ступень диссоциации бесспорно отвечает карбоксильной группе цвиттериона.

В 50%-ном водном этаноле эти авторы получили значения $pK_{a1} = 6.35$ и $pK_{a2} = 7.19$ ($I = 0.1$ М), соответственно, причем нейтральной форме приписывают исключительно хиноидное строение (III), а значения констант относят к группам COOH и OH [154]. Тогда неясно, почему столь резко (на 4 единицы) повышается pK_a карбоксильной группы при переходе от воды к 50%-ному спирту, если pK_a бензойной кислоты при этом увеличивается всего примерно на 1.5 единицы [219]? К тому же резкое обесцвечивание формы H_2R в этих условиях [243,283,312-314] свидетельствует о преобладании лактонной структуры. Наше же объяснение эффектов среды (ΔpK_a) основывается на учете сдвига положения таутомерных равновесий при варьировании растворителя [ур. (21), (22); см. ниже].

Между тем, Д. Фомпеди и П. Левийен [145] значение pK_{a1} флуоресцеина в водном растворе (= 4.4) полностью относят к карбоксильной группе, сопоставляя с другим значением pK_a карбоксильной группы, а именно, со значением pK_{a2} эозина (= 4.4) [145], чем отчасти и аргументируют адекватность своей схемы превращений красителей. Но в более поздней работе [152] они дают несколько иные значения pK_a эозина, а кроме того, при диссоциации одной и той же группы в случае нейтральной кислоты pK_a должно быть ниже, чем у анионной [ур. (11); см. также раздел 4.4]. В другом исследовании [159] значение pK_{a1} 4'-иодацетамидофлуоресцеина в воде и в водно-диоксановых смесях приписывается целиком карбоксильной группе. Это тем более нелогично, поскольку и в воде, и даже в 20 %-ном водном 1,4-диоксане эти авторы предполагают сосуществование всех трех таутомеров нейтральной формы флуоресцеина.

Во многих работах значение pK_{a1} флуоресцеина по-прежнему относят к карбоксильной группе [а pK_{a0} – к равновесию катион (I) \rightleftharpoons хиноид (III)], несмотря на преобладание лактонной структуры IV нейтральной формы [201,315].

С другой стороны, анализ литературы последних лет показывает, что предложенная нами схема детального равновесия флуоресцеина [248] подтверждается другими авторами. Выше уже отмечалось сходство полученных З. Тамурой с соавторами [167] значений долей таутомеров нейтральной формы в воде с нашими данными. В работе Н. Клониса и В. Сэвайера [169,170] фактически воспроизводятся полученные нами значения микроконстант диссоциации [248]. Так, для водного раствора при $I = 0.1$ М этими авторами сообщаются следующие значения показателей микроконстант (в наших обозначениях): $pk_{\pm,COOH} = 3.0$, $pk_{0,OH} = 3.2$, $pk_{1,Z} = 3.5$, $pk_{1,COOH} = 3.3$. Используя наши значения $pK_{a0} = 2.26$, $pK_{a1} = 4.32$ и $pK_{a2} = 6.50$ и учитывая, что варьирование ионной силы мало сказывается на положении таутомерных равновесий флуоресцеина, получаем: $pk_{\pm,COOH} = 2.92$, $pk_{0,OH} = 3.22$, $pk_{1,Z} = 3.66$, $pk_{1,COOH} = 3.36$ (в таблице 7 даны термодинамические значения показателей микроконстант, несколько отличающиеся от последних значений). Совпадают и значения показателя константы равновесия между катионом и лактоном (2.4 и 2.43 соответственно).

4. Влияние растворителя на прототропное равновесие флуоресцеина

Эффекты среды, или значения ΔpK_a , зарегистрированные при переходе от воды к неводным растворителям

$$\Delta pK_a = pK_a - pK_a \text{ (в воде)} \quad (19)$$

для флуоресцеина и его производных часто имеют на первый взгляд трудно предсказуемый характер. В ряду однотипных реагентов, различающихся только заместителями, значения ΔpK_a , отвечающие одной и той же ступени диссоциации, совершенно различны, как это имеет место, например, для флуоресцеина и эозина. Ниже рассмотрим прежде всего данные для незамещенного флуоресцеина.

Зависимость значений K_T от состава растворителя. Значительный интерес представляет вопрос о количественном описании влияния свойств растворителя на таутомерию молекулярной формы флуоресцеина. Поскольку в безводных растворах и даже в смесях с небольшой долей органического сорастворителя признаков цвиттериона II в электронных спектрах поглощения нейтральной формы флуоресцеина не имеется [222,241,277-290,296], проблема сводится главным образом к равновесию (III \rightleftharpoons IV). В литературе давно дискутировался вопрос о том, какие параметры растворителя определяют положение таутомерных равновесий ксантовых красителей. В частности, лактонные формы молекул красителей дестабилизируются как за счет водородных связей с молекулами растворителя, так и за счет повышения значений ε ; использовалась также корреляция с параметром Гильдебранда [146]. Нами было показано [243,296], что значения энергии Гиббса (в кДж моль⁻¹) таутомеризации (III \rightleftharpoons IV) в растворителях различной природы (спирты, хлороформ, ДМФА, смеси воды с этанолом, 1,4-диоксаном, ДМСО и ацетоном) можно описать, используя лишь один параметр растворителя, а именно — нормализованный параметр Райхардта [316]:

$$\Delta G_{TAUT} = -26.1 + 21.59 E_T^N; \quad n = 39; r = 0.903 \quad (20)$$

(В пределах одной водно-органической смеси коэффициенты корреляции выше). Поскольку функция E_T^N отражает как способность растворителя выступать донором водородных связей, так и его полярность [316], то таким образом достигается компромисс между точкой зрения об исключительной роли водородных связей и электростатическими представлениями. Экстраполяция зависимости (20) к $E_T^N \rightarrow 0$ позволяет предсказать “предельное” значение K_T для флуоресцеина в растворах: $4 \cdot 10^4$. Экспериментальная оценка значений K_T в столь малополярных средах затруднена крайне низкой растворимостью в них красителя. Экстраполяция же к газовой фазе ($E_T^N = -0.11$ [57]) дает значение $K_T = 1 \cdot 10^5$. В то же время, по данным квантово-

химических расчетов, опубликованных в последнее время Д. С. Чунгом с сотрудниками [218], для флуоресцеина в вакууме $K_T = 2.5 \cdot 10^3$, что существенно ниже и соответствует значению $E_T^N = 0.3$.

В работе Н. Клониса и В. Сэвайера [170] также отмечается сдвиг положения таутомерного равновесия нейтральной формы флуоресцеина от цвиттериона II и хиноида III в сторону лактона IV при переходе от воды к водно-органическим смесям с мольной долей воды 0.50. Впрочем, эти авторы говорят об исчезновении первых двух таутомеров, хотя, как было неоднократно показано в наших работах, даже очень малую долю таутомера III на фоне бесцветного лактона IV все же можно оценить достаточно точно.

В работе К. Драммонда и соавторов [159] для 4'-иодацетамидофлуоресцеина в водно-диоксановых смесях при массовой доле 1,4-диоксана 40 % и выше признаков окраски нейтральной формы не обнаружено, а при массовой доле 1,4-диоксана 20 % предполагается сосуществование всех трех таутомеров, причем хиноиду (структура типа III) приписывается полоса 483 нм, а цвиттериону (структура, аналогичная таутомеру II) – 443 нм. В ходе нашего исследования равновесий незамещенного флуоресцеина в 20%-ном водном 1,4-диоксане признаков цвиттериона II в спектрах нейтральной формы не обнаружено. Причиной такого расхождения может быть как специфика влияния иодацетамидного заместителя в кольце фталевой кислоты, так и то, что спектр формы H_2R в цитируемой работе не был, по-видимому, уточнен расчетом по уравнению (9), и полоса 443 нм в малоинтенсивном спектре поглощения, приписанная цвиттерионному таутомеру формы H_2R , могла быть обусловлена поглощением примесей катиона H_3R^+ .

Другой подход к описанию сольватации флуоресцеина в неводных средах, предложенный индийскими авторами [25], основан на использовании модели адсорбции молекул растворителя на молекуле красителя.

Интерпретация изменений pK_a . Зависимости pK_a от характера растворителя, в частности, от состава смешанных растворителей (рис. 7, табл. 3-7), в ряде случаев носят необычный характер и нуждаются в объяснении. Особенно это касается сближения и даже инверсии констант K_{a1} и K_{a2} . Нами впервые было показано, что интерпретация значений ΔpK_a флуоресцеина и его производных может быть проведена лишь с учетом влияния растворителя на таутомерные равновесия [222,241,243,255,277-290,295,296,311-313].

Из соотношений (15), (16) следует, что величины ΔpK_a являются составными, и их значения определяются как значениями ΔpK , так и смещением положения таутомерных равновесий (изменением значений K_T и K_T'). Для флуоресцеина справедливы соотношения:

$$\Delta pK_{a0} = \Delta pK_{0,OH} - \Delta \lg (1 + K_T + K_T') = \Delta pK_{\pm,COOH} - \Delta \lg \{1 + K_T'' + (K_T')^{-1}\}; \quad (21)$$

$$\begin{aligned} \Delta pK_{a1} &= \Delta pK_{1,COOH} + \Delta \lg (1 + K_T + K_T') \\ &= \Delta pK_{1,Z} + \Delta \lg \{1 + K_T'' + (K_T')^{-1}\} \end{aligned} \quad (22)$$

$$\Delta pK_{a2} = \Delta pK_{2,OH} \quad (23)$$

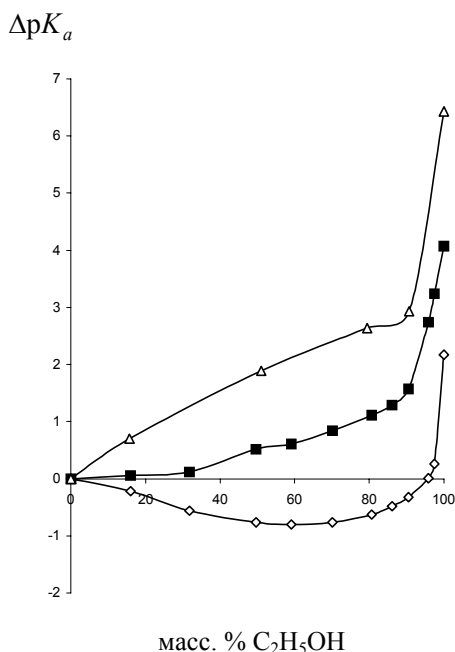


Рис. 11. Зависимости $\Delta pK_{1,COOH}$ флуоресцеина (Δ), ΔpK_{a0} (\diamond) и ΔpK_{a1} (\blacksquare) 6-гидрокси-9-фенилфлуорона от состава водно-этанольной смеси [243,310].

или иной мере напоминает U-образную, и значения $\Delta pK_{0,OH}$ в водно-этанольных смесях не являются исключением. Значения $\Delta pK_{1,OH}$, напротив, возрастают монотонно, что также в большинстве случаев характерно для типа заряда $A^{\circ}B^{-}$. Значения ΔpK_a для карбоновых кислот как правило выше, чем для фенолов, что подтверждают представленные на том же рисунке значения $\Delta pK_{1,COOH}$ флуоресцеина.

Сильное дифференцирующее действие проявляют дипольные апротонные растворители, в которых указанные закономерности особенно четко выражены.

Из уравнений (21)-(23) легко получить соотношения, позволяющие объяснить изменение соотношений между константами ступенчатой диссоциации:

$$\Delta(pK_{a1} - pK_{a0}) = \Delta pK_{1,COOH} - \Delta pK_{0,OH} + 2\Delta \lg(1 + K_T + K_T') \quad (24)$$

$$\Delta(pK_{a2} - pK_{a1}) = \Delta pK_{2,OH} - \Delta pK_{1,COOH} - \Delta \lg(1 + K_T + K_T') \quad (25)$$

Для флуоресцеина переход от воды к неводным средам приводит к расхождению значений pK_{a0} и pK_{a1} , например, в 90 %-ном (по массе) водном ацетоне соотношение K_{a0}/K_{a1} увеличивается в два миллиарда раз по сравнению со значением в водном растворе. Так как $\Delta pK_{1,COOH} > \Delta pK_{0,OH}$, а K_T существенно возрастает при переходе к неводному растворителю (причем $K_T \gg K_T'$), подобное изменение значения K_{a0}/K_{a1} легко объяснимо. Например, в 90 %-ном водном ацетоне $2\Delta \lg(1 + K_T + K_T') = 6.56$, а $\Delta pK_{1,COOH} - \Delta pK_{0,OH} = 5.0$.

Напротив, значения pK_{a1} и pK_{a2} сближаются (табл. 3-7, рис. 7), иногда вплоть до инверсии ($pK_{a1} > pK_{a2}$), в то время как для его 2,4,5,7-тетрабромпроизводного ситуация противоположная (о чем еще будет сказано ниже).

В статье, опубликованной в одном из предыдущих выпусков настоящего журнала, мы подробно разбирали вопрос об инверсии констант ступенчатой диссоциации двухосновных кислот [320]. Там же приведены некоторые примеры инверсии либо существенного сближения указанных констант, имеющиеся в литературе. Важно отметить, что даже в случае одинаковых по силе кислотных групп (например, в алифатических дикарбоновых кислотах с практически изолированными карбоксильными группами) значения pK_{a1} и pK_{a2} еще не совпадают. Так, для

Эти уравнения позволяют выделить вклад сдвигов положений таутомерных равновесий в значения ΔpK_a и проанализировать значения ΔpK .

Оказалось, что влияние растворителя на значения pK носит достаточно традиционный характер и определяется как типом заряда, так и природой диссоциирующей группы. В частности, при прочих равных условиях $\Delta pK_{COOH} > \Delta pK_{OH}$, а ΔpK катионных кислот меньше, чем нейтральных и анионных. Это согласуется с известными представлениями Бренстеда, Кольтгофа, Измайлова, Бейтса, Белла и других авторов [219,306,316-318] и косвенно подтверждает правильность оценок констант таутомеризации, а, следовательно, и адекватность детальной схемы равновесий. Типичный пример зависимостей ΔpK_{a0} ($= \Delta pK_{0,OH}$) и ΔpK_{a1} ($= \Delta pK_{1,OH}$) для 6-гидрокси-9-фенилфлуорона в системе вода – этанол представлен на рисунке 11.

Тип заряда кислотно-основной пары для диссоциации катиона H_2R^+ обозначается, по Кольтгофу и Бейтсу [219], как A^+B° , а для диссоциации HR – как $A^{\circ}B^{-}$. В самых различных водно-органических смесях зависимость для катионных кислот (A^+B°) в той

кислот $\text{HO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ при $n \rightarrow \infty$, когда влияние заряда, образующегося при диссоциации первой группы (ур. 18), пренебрежимо мало, предел разности ($pK_{a2} - pK_{a1}$) равен не нулю, а $\lg 4 = 0.60$ [320]. Поэтому инверсию констант ступенчатой диссоциации следует ожидать в том случае, когда при высокой стабильности двухзарядного аниона (R^{2-}) имеются факторы, дополнительно стабилизирующие нейтральную форму (H_2R). Причем эти факторы не должны играть стабилизирующую роль в случае моноаниона (HR^-).

Пример флуоресцеина показывает, что таким фактором может быть сдвиг положения таутомерного равновесия. Моноанион HR^- флуоресцеина (но не эозина!) существует в растворах в виде структуры V. Таким образом, значение pK_{a2} соответствует диссоциации гидроксильной группы ($pK_{2,\text{OH}}$). Так как константы диссоциации таких групп уменьшаются при переходе от воды к органическим растворителям не так резко, как в случае карбоксильных групп (и действительно, после оценки микроконстант диссоциации оказалось, что $\Delta pK_{1,\text{COOH}} > \Delta pK_{2,\text{OH}}$, см. табл. 7), а положение таутомерного равновесия нейтральной формы с ростом содержания ацетона в смешанном растворителе заметно смещается ($\text{III} \rightarrow \text{IV}$; цвиттерионный таутомер II исчезает при уже первых добавках органических растворителей к воде), то значения K_{a1} и K_{a2} постепенно сближаются, а затем константы вновь расходятся, но уже в обратном порядке. Такая тенденция к сближению K_{a1} и K_{a2} наблюдается для флуоресцеина при переходе от воды ко всем исследованным водно-органическим смесям (табл. 3-7, рис. 7), даже если инверсии и не удавалось достичь.

Интерпретация изменений констант таутомерных равновесий флуоресцеина при переходе от воды к органическим растворителям с использованием микроконстант диссоциации. Если исходить из того, что микроконстанты диссоциации флуоресцеина изменяются традиционным образом, в соответствии с типом заряда кислотно-основной пары, то тогда, в свою очередь, разъясняются изменения некоторых констант таутомеризации, происходящие при варьировании растворителя. Например, из схемы 1 легко вывести уравнения (26) и (27):

$$\lg K'_T = pK_{0,\text{OH}} - pK_{\pm,\text{COOH}} = pK_{1,Z} - pK_{1,\text{COOH}} \quad (26)$$

$$\lg K''_T = \lg K_T + pK_{\pm,\text{COOH}} - pK_{0,\text{OH}} \quad (27)$$

Характер изменения константы $K_{\pm,\text{COOH}}$, соответствующей типу заряда A^+B^{\pm} , прослеживается на примере родамина Б [242,285,291-294,296] и гораздо ближе к зависимости для типа заряда A^0B^- , чем для типа заряда A^+B^0 . Это вполне согласуется с представлениями Кольтофа – Бейтса [219]. Напротив, изменения $pK_{1,Z}$ (тип заряда A^{\pm}B^-), судя по данным о pK_{a1} сульфифлуоресцеина (табл. 5,6), ближе по своему характеру к зависимостям для кислотно-основных пар A^+B^0 , что также вполне предсказуемо [219,243].

Отсюда становится понятным практически полное исчезновение цвиттерионной структуры II флуоресцеина при переходе от воды к неводным средам, поскольку типы зарядов и природа функциональных групп позволяют предвидеть соотношения значений $\Delta pK : \Delta pK_{1,Z} < \Delta pK_{1,\text{COOH}}$ и $\Delta pK_{0,\text{OH}} < \Delta pK_{\pm,\text{COOH}}$, что приводит к снижению K'_T и росту K''_T .

Далее, из схемы 1 вытекает соотношение между константой таутомерного равновесия, K_{Tx} , и показателями микроконстант диссоциации:

$$\lg K_{Tx} = pK_{1,\text{COOH}} - pK_{1,\text{OH}} = pK_{2,\text{COOH}} - pK_{2,\text{OH}} \quad (28)$$

Поскольку при одинаковом типе заряда кислотно-основных пар (A^0B^- либо A^-B^{2-}) обычно выполняется соотношение $\Delta pK_{\text{COOH}} > \Delta pK_{\text{OH}}$, то можно было бы, вообще говоря, ожидать смещения положения таутомерного равновесия ($\text{V} \rightleftharpoons \text{VI}$) вправо при переходе от воды к органическим растворителям. Но, как было сказано выше, в электронных спектрах поглощения моноаниона HR^- флуоресцеина признаков таутомера VI не наблюдается ни в одном из исследованных растворителей. Не сообщалось о полосе поглощения моноаниона флуоресцеина с $\lambda_{\text{max}} \geq \lambda_{\text{max}}(\text{R}^{2-})$ и в работах других авторов. Единственным исключением является работа Н. Клониса и В. Сэвайера [170], в которой такая полоса, хотя и малоинтенсивная, была обнару-

жена, наряду с традиционным спектром моноаниона флуоресцеина (подобным нашим данным, представленным на рис. 10), в смеси воды с ДМСО при мольной доле органического соразвителя 0.50. Впрочем, исходный спектр поглощения флуоресцеина в безбуферной среде, из которого был выделен спектр моноаниона путем вычитания поглощения дианиона R^{2-} , в значительной мере уже напоминал спектр последнего. Вполне возможно поэтому, что речь идет о недостаточной вычислительной «очистке» от спектра R^{2-} .

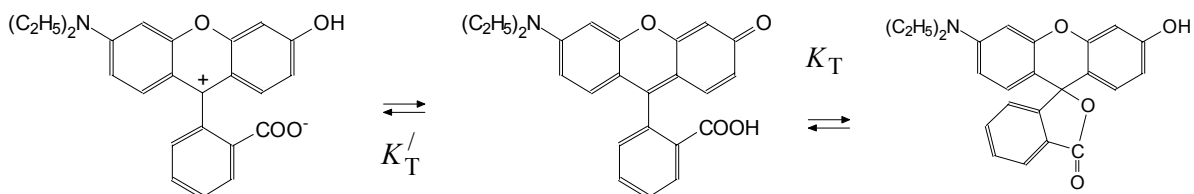
Сравнительно недавно появилась теоретическая работа, в которой на основании квантово-химических расчетов делаются выводы о преобладании тех или иных таутомеров нейтральной и анионной форм флуоресцеина не только в газовой фазе, но и в растворителях различной полярности [218]. Авторы указанной работы, подтверждая на основании расчетов *ab initio* наши выводы о преобладании лактона IV над хиноидом III в растворах, делают тем не менее вывод о том, что для флуоресцеина даже в водном растворе уже примерно треть моноанионов HR^- существует в виде таутомера VI, а в ДМСО и тем более в газовой фазе этот таутомер преобладает над таутомером V. В то время как вывод для вакуума, вероятно, справедлив, поскольку в газовой фазе даже кислотность фенола становится примерно равной кислотности бензойной кислоты [321], то для воды такое утверждение явно противоречит экспериментальным данным.

Кроме того, для флуоресцеина оценка K_{Tx} при помощи уравнения (28), с использованием данных табл. 3-7, приводит к значению 0.003 в 91%-ном водном этаноле, 0.05 в метаноле, < 0.1 в 82%-ном водном бутаноле-1, 0.02 в этаноле, 0.004 в ДМФА, 0.08 в 64%-ном водном 1,4-диоксане, 0.09 в 90%-ном водном ацетоне и 0.16 в 91%-ном водном ДМСО. Наконец, для водных растворов флуоресцеина такие оценки приводят к наименьшему значению: $K_{Tx} = 0.002$.

Таким образом, хотя квантово-химические расчеты, проведенные Д. Чунгом с сотрудниками, верно отражают тенденцию к сдвигу равновесия от таутомера V к таутомеру VI при переходе от воды к органическим растворителям, но доля частиц VI при этом явно переоценивается. Причину следует, вероятно, искать в том, что в расчетах влияние растворителя учитывается лишь наложением диэлектрического континуума, без учета специфических взаимодействий, в частности, водородных связей. Последние же бесспорно стабилизируют структуру V гораздо сильнее, чем структуру VI. Не случайно по результатам расчетов *ab initio*, проведенных Д. Чунгом с сотрудниками, и цвиттерионная структура II для флуоресцеина в воде должна быть исключена, хотя именно в этом случае по данным электронной спектроскопии доля ее от общей концентрации нейтральной формы значительна [248]. В самом деле, именно гидратация карбоксилатной группировки, имеющейся как в структуре II, так и в структуре V, не может быть учтена при расчетах, в которых вода рассматривается лишь как среда, характеризующаяся определенным значением относительной диэлектрической проницаемости и поляризуемости молекул.

В обсуждаемой работе южнокорейских авторов сказано, что мы вначале [289] утверждали, что в водном растворе на долю таутомера II приходится 22% молекул H_2R , а в более поздней работе [322] сообщили, что не находим признаков существования цвиттерионного таутомера. Но при этом упускается из виду, что во втором случае речь идет уже не о водном растворе флуоресцеина, а о мицеллярном растворе катионного поверхностно-активного вещества; в этих условиях флуоресцеин связывается мицеллами, и положение таутомерного равновесия смещается в сторону хиноидной (III) и особенно лактонной (IV) форм, как это вообще происходит при замене водного окружения на неводное (или водно-органическое).

Прототропные равновесия N,N-диэтилродола и родола. Наряду с протолитическими равновесиями уже упоминавшегося родамина Б и других родаминов мы исследовали превращения своеобразной группы ксантеновых красителей – родолов, являющихся гибридами флуоресцеина и родаминового красителя. Эти соединения по характеру равновесий занимают промежуточное положение между гидроксиксантеновыми и аминоксантеновыми красителями; катион диссоциирует в две ступени ($H_2R^+ \rightleftharpoons HR \rightleftharpoons R^-$), а нейтральная форма HR может существовать в виде трех таутомеров [256,284,287,296]:



В наших работах использовались препараты, синтезированные В. И. Алексеевой с сотрудниками (НИОПиК, Москва). Примеры спектров представлены на рис. 12 (см. также табл. 2), а значения pK_a будут даны ниже в таблицах 7,8,14-16.

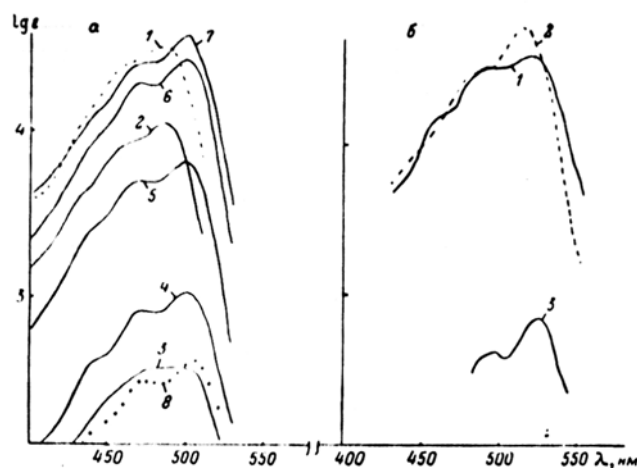
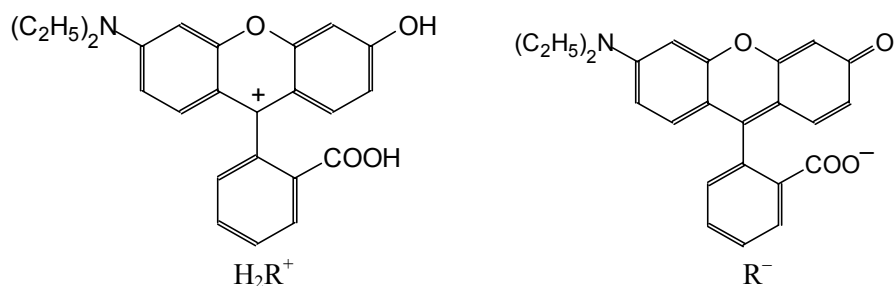


Рис. 12. Спектры родола (а) и *N,N*-диэтилодола (б) в 90 %-ном (по массе) водном ацетоне; (а): 1 – $pa_{H^+}^* = 1.38$ (спектр H_2R^+); 2 – $pa_{H^+}^* = 4.10$; 3 – $pa_{H^+}^* = 6.58$; 4 – $pa_{H^+}^* = 9.84$; 5 – $pa_{H^+}^* = 10.92$; 6 – $pa_{H^+}^* = 12.45$; 7 – $6 \cdot 10^{-4}$ NaOH (спектр R^-); 8 – спектр HR (рассчитанный из спектра № 3); (б): 1 – H_2R^+ ; 2 – R^- ; 3 – HR (рассчитанный из спектров при $pa_{H^+}^* = 7.97$ и 8.87) [256].

В принципе подход к оценке долей таутомеров остается тем же, что и в случае «материнских» красителей, но спектры катионов и анионов H_2R^+ и R^- (рис. 12) более похожи друг на друга, чем в случае флуоресцеина, для которого значения λ_{max} форм H_3R^+ и R^{2-} различаются как минимум на 50 нм, а в некоторых растворителях – еще больше.



Следовательно, у родолов меньше различаются и спектры двух таутомеров нейтральной формы HR: цвиттериона и хиноида [256,284,287,296]. Это затрудняет оценки констант таутомерных равновесий. Тем не менее, в 90 %-ном по массе водном ацетоне для родола и *N,N*-диэтилодола удалось получить оценку значения $pK_{1,COOH}$, равную 9.5, что согласуется со значением для флуоресцеина (9.2, табл. 3,7). Различие в 0.3 единицы может быть объяснено большей электронодонорностью amino- и диэтиламиногрупп по сравнению с гидроксигруппой, что приводит к снижению эффективного положительного заряда на центральном атоме углерода в случае родолов.

5. Прототропные равновесия галогенпроизводных флуоресцеина в растворах

Эозин и другие гидроксиксантены, содержащие галогены в кольце резорцина, относятся к числу наиболее популярных и многократно исследованных производных флуоресцеина. Ниже рассмотрим их ионные равновесия в воде и в неводных средах.

Константы диссоциации и таутомерия моноанионов в водных растворах. В ряде работ начиная с 1948 года содержится вывод о том, что в случае эозина и других 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина моноанион HR^- существует не в виде таутомера типа V, как в случае флуоресцеина, а в виде таутомера VI [31,32,88,145]. Но наряду с этим многие авторы считали, что ион HR^- эозина существует в виде таутомера типа V [59,123,201].

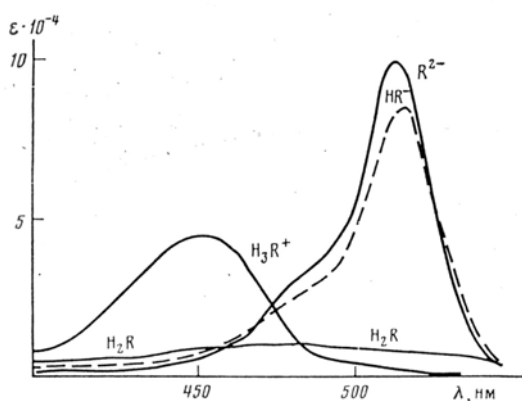


Рис. 13. Спектры ионных и молекулярной форм эозина в водных растворах; спектр R^{2-} измерен в растворах NaOH при pH = 10, H_2R – в растворах серной кислоты при pH 0-0.5; H_3R^+ – в 70 %-ной H_2SO_4 ; спектр моноаниона HR^- рассчитан из спектров при $2.3 \leq pH \leq 3.2$ [251].

Окончательный вывод о строении моноаниона можно сделать лишь после выделения его спектра «в чистом виде» из спектров смесей различных форм (H_2R , HR^- , R^{2-}). При исследовании водных растворов это является непростой задачей ввиду близости значений pK_{a1} и pK_{a2} . Это выделение спектра HR^- из экспериментальных спектров, измеренных при различных значениях pH, с помощью значений pK_a было впервые произведено в нашей работе [251] (рис. 13). Обработка результатов спектрофотометрических измерений проводилась различными вариантами, в том числе линейным и нелинейным способами наименьших квадратов [249,251]. По нашим данным, наиболее достоверными являются значения $pK_{a1} = 2.77 \pm 0.06$, $pK_{a2} = 3.64 \pm 0.09$ при $I = 0.01$ М [249, 274], термодинамические значения: $pK_{a1} = 2.81$, $pK_{a2} = 3.75$ (табл. 1). Эти результаты были получены нами спектрофотометрически, при рабочей концентрации эозина $1.87 \cdot 10^{-6}$ М, общее число растворов с различными значениями pH равно 24.

Спектр иона R^{2-} в водном растворе характеризуется значениями $\lambda_{max} = 515$ нм и $E_{max} = 96.7 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹ (табл. 2). Спектральные характеристики других ионных и молекулярной форм эозина можно найти также в табл. 2. Здесь невозможно перечислить все литературные данные для дианиона R^{2-} ; упомянем лишь значения 517 нм ($111.5 \cdot 10^3$) [268] и 516 нм ($102.4 \cdot 10^3$) [323], полученные с особо чистыми препаратами. Более подробная сводка литературных данных для эозина и других 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных имеется в наших работах [221,252].

Раздельное рассмотрение равновесий диссоциации эозина в воде приводит к значениям $pK_{a1} = 2.48$, $pK_{a2} = 3.31$ при $I = 0.1$ М, но при этом интенсивность полосы, отнесенной к моноаниону HR^- , в пять раз ниже интенсивности полосы дианиона R^{2-} [142,143]; в другой работе спектрофотометрические исследования привели к значениям $pK_{a1} = 2.48$, $pK_{a2} = 3.46$ [104].

По данным Фомпеди и Левийена, исследовавших диссоциацию эозина спектрофотометрически в буферных растворах Бриттона – Робинсона, значения pK_{a1} и pK_{a2} равны соответственно 2.85 и 4.47 [145]. Такой результат был получен методом Анга; в более позднем исследовании, применив метод производной спектрофотометрии, эти авторы пришли к значениям соответственно 3.25 и 3.80 [152]. Во втором случае имеет место явное завышение значения pK_{a1} , а в первом значение pK_{a2} противоречит, с нашей точки зрения, характеру зависимости оптической плотности от pH, представленной самими авторами [145]. В другой работе [150] характер зависимости светопоглощения при 552 нм от pH действительно указывает на то, что $pK_{a2} > 4$, но данные получены при концентрации эозина, равной $1.5 \cdot 10^{-4}$ М, и раствор красителя при этом стабилизировался добавками желатины. Как будет видно из последующих разделов, значение pK_{a2} эозина в органическом микроокружении заметно повышается.

Вообще, корректное определение значений pK_a эозина в воде, в особенности значения pK_{a2} , сильно осложнено близостью спектров R^{2-} и HR^- . В результате многие авторы [129,132,133] не проводят раздельного определения pK_{a1} и pK_{a2} в воде, а приводят лишь одно значение pK_a , от 3.44 до 3.8. Не удалось и определение значения pK_{a2} 4'-иодацетамидэозина в воде [159]. Как показали наши исследования, достаточно надежные оценки pK_{a2} можно получить лишь при использовании в качестве аналитических длин волн $\lambda > \lambda_{\max}(R^{2-})$, а в остальных случаях характер зависимости светопоглощения от pH может создать видимость одноступенчатой диссоциации. Так, только одно значение pK_a , а именно $pK_{a1} = 3.6$, было найдено при $I = 0.8$ М (KCl) [137]. Потенциометрическое же титрование привело авторов этой работы к значениям $pK_{a1} = 5.2$ и $pK_{a2} = 6.3$ [137], что плохо согласуется со значениями $pK_{a1} = 4.9$ и $pK_{a2} = 3.9$, полученными другими авторами титрованием водных растворов динатриевой соли эозина раствором HCl [266]. Низкая растворимость нейтральной формы эозина в воде ($2 \cdot 10^{-6}$ М [251]) делает результаты потенциометрического определения констант диссоциации ненадежными.

Данные о распределении эозина между водой и хлороформом приводят к значениям $pK_{a2} = 4.78$ [144] и $pK_{a1} + pK_{a2} = 6.8$ [128].

Оценки долей таутомеров моноанионной и нейтральной форм эозина, проведенные нами на основании электронных спектров поглощения, привели к значениям: $\alpha_V = 0.19$, $\alpha_{VI} = 0.81$, $\alpha_{III} = 0.311$, $\alpha_{II} = 0.053$, $\alpha_{IV} = 0.636$. Отсюда $K_{Tx} = 4.3$, $K_T = 2.04$ и $K'_T = 0.17$ [249,251]. Однако различие интенсивности полос моно- и дианионов не слишком велико и может быть и не связано с существованием части ионов HR^- в виде таутомера типа V. Во многих неводных растворителях, исследованных нами впоследствии, соотношение $E_{\max}(HR^-)/E_{\max}(R^{2-})$ колеблется вблизи значения 0.85, хотя, судя по уравнению (28), доля «карбоксилатного» таутомера в органических растворителях должна заметно снизиться по сравнению с водным раствором. Поэтому, хотя значения $pK_{1,OH} = 2.39$, $pK_{1,COOH} = 3.02$, $pK_{2,COOH} = 3.66$, $pK_{2,OH} = 3.03$ и $pK_{0,OH} = -1.5$ выглядят достаточно правдоподобно, значения α_{VI} и K_{Tx} могут быть в действительности несколько выше. Но значения $pK_{\pm,COOH} = -0.7$ и $pK_{1,Z} = 2.25$ выглядят гораздо менее правдоподобными, если учесть, что для флуоресцеина эти значения составляют соответственно 2.80 и 3.79. В самом деле, кажется маловероятным, чтобы введение четырех атомов брома в кольца резорцина усилило кислотность карбоксильной группы в остатке фталевой кислоты на 3.5 порядка, а кислотность гидроксигруппы в самом ксантеновом цикле всего на 1.5 порядка. Поэтому даже малое значение α_{II} может быть мнимым и не отражать действительного вклада в спектр нейтральной формы составляющей, аналогичной спектру катиона H_3R^+ .

Данные о константах диссоциации 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина в воде в известной нам литературе отсутствуют, в то время как для 2,7-дихлорфлуоресцеина имеются графические оценки $pK_{a0} = 0.6$, $pK_{a1} = 3.9$ и $pK_{a2} = 5.1$ [129], а также значения $pK_{a0} = 0.47$, $pK_{a1} = 3.50$ и $pK_{a2} = 4.95$, полученные при $I = 0.025$ - 0.1 М итерационным методом [34], и значения $pK_{a1} = 3.69$ и $pK_{a2} = 4.71$, найденные при изолированном рассмотрении равновесий ступенчатой диссоциации [133]. Наши данные, представленные в табл. 1, получены совокупным расчетом констант диссоциации и спектральных характеристик ионных и молекулярных форм.

Спектры нейтральных форм обоих хлорпроизводных флуоресцеина свидетельствуют о преобладании бесцветного лактонного таутомера (типа IV), но если у 2,7-дихлорфлуоресцеина надежно удастся установить лишь значение $\alpha_{III} = 0.32$, а значение α_{II} оценено ориентировочно (≈ 0.04), то в случае 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина, наоборот, $\alpha_{II} = 0.12$, $\alpha_{III} \approx 0.03$ [243,257].

Хотя спектр моноаниона 2,7-дихлорфлуоресцеина в воде несколько различается в зависимости от способа обработки равновесных спектрофотометрических данных [242,257], все же явных признаков наличия таутомера типа VI в водных растворах еще не имеется. Значение $pK_{1,COOH} = 3.50$ совпадает с аналогичным значением для флуоресцеина, а значение $pK_{2,OH} = 5.19$

отражает влияние одного атома хлора, находящегося в *орто*-положении к гидроксигруппе (для флуоресцеина $pK_{2,OH} = 6.80$).

Следует отметить, что из значений pK_a 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных в водных растворах в табл. 1 представлены лишь значения для эозина. Что касается эритрозина, бенгальского розового А, бенгальского розового Б, флоксина А и Б, то ограниченная растворимость их молекул H_2R в воде не позволяет считать опубликованные значения pK_a в полном смысле слова равновесными. Из водных растворов при значениях pH, отвечающих условиям доминирования нейтральных форм, постепенно выделяется твердая фаза, хотя иногда этот процесс протекает медленно и плохо заметен из-за малой концентрации красителей (10^{-5} - 10^{-6} М).

В частности, потенциометрическое титрование растворов R^{2-} в воде кислотой по двум ступеням позволило получить лишь приближенные оценки pK_a от 4.1 до 4.55 для дихлорфлуоресцеина, эритрозина и бенгальского розового Б [75].

Но и спектрофотометрическое исследование, проводимое при гораздо меньших концентрациях, весьма затруднено. В частности, полосы ионов R^{2-} и HR^- в воде разрешены в случае эритрозина (2,4,5,7-тетраиодфлуоресцеина) даже несколько хуже, чем для эозина. При обработке большого массива данных при $I = 0.01$ М и 23.5 °С применение нелинейного метода наименьших квадратов привело нас к оценкам: $pK_{a1} = 3.92 \pm 0.12$ и $pK_{a2} = 5.16 \pm 0.28$, термодинамические значения: соответственно 4.0 и 5.3 [324]. Спектральных характеристики представлены в табл. 2. Однако обработка тех же данных по программе CLINP приводит к значениям $pK_{a1} = 3.77 \pm 0.05$ и $pK_{a2} = 4.0 \pm 0.1$ ($I = 0.01$ М); спектр формы HR^- при этом характеризуется несколько более низкой интенсивностью ($E_{max} = 73 \cdot 10^3$ вместо $91.9 \cdot 10^3$) [243]. Поскольку подобной неоднозначности для других красителей нами не наблюдалось, значения pK_a для эритрозина в табл. 1 не включены. Среди литературных данных имеется еще больший разброс, причем не только для значений pK_{a2} , но и для pK_{a1} . Так, при помощи спектрофотометрического метода определены значения $pK_{a1} = 3.79$ и $pK_{a2} = 5.05$ (способ расчета и значение I не указаны) [104], а в другой работе [143] приводятся значения соответственно 2.59 и 4.00, полученные при $I = 0.1$ М на основании изолированного рассмотрения двух равновесий. В некоторых работах приводится лишь одно значение pK_a , в связи с невозможностью раздельной оценки pK_{a1} и pK_{a2} из спектральных данных: 4.3 [129] и 4.18 [132]. По этой же причине лишь одно значение $pK_a = 4.55$ получено потенциометрическим методом [75], в то время как в другой работе тем же методом определены значения $pK_{a1} = 5.0$ и $pK_{a2} = 4.5$ [266]. Впрочем, ввиду крайне низкой растворимости нейтральной формы эритрозина в воде (по нашим оценкам, не выше $1 \cdot 10^{-6}$ М) результаты определения констант диссоциации методом потенциометрического титрования в этом растворителе ненадежны.

Вероятно, в случае бенгальского розового Б, молекула которого содержит уже восемь атомов галогенов, именно малая растворимость нейтральной формы, еще меньшая, чем у эритрозина, приводит к серьезному разнобою в опубликованных значениях pK_{a1} и pK_{a2} в воде. Так, при 20-25 °С в литературе имеются следующие значения, определенные главным образом при помощи спектрофотометрического метода: 4.46 и 5.72 [104], 4 и 4.4 [135], 3.51 и 4.05 [151], 3.90 и 4.70 ($I = 0.1$ М) [143], 4.25-4.26 и 5.25-5.32 (10 % этанола, результаты спектрофотометрического и потенциометрического метода хорошо согласуются) [149]. Интересно, что значения pK_{a1} и pK_{a2} при более высоком содержании этанола (50 %), определенные потенциометрически, оказываются даже ниже, чем в воде: соответственно 3.96 и 4.54 [135]. В некоторых работах предполагается, что в водных растворах для бенгальского розового Б значение pK_{a1} равно pK_{a2} и составляет ≈ 4.3 [129] или 3.72 [133].

Значения pK_{a1} и pK_{a2} в воде для бенгальского розового А найдены равными 4.16 и 4.78 ($I = 0.1$ М) [143], 4.18 и 4.87 [135]; для флоксина Б: 2.18 и 3.55 [59]; для 2,4,5,7,3',4',5',6'-октабромфлуоресцеина: 2.23 и 4.20 [59].

Значения E_{\max} дианионов R^{2-} галогенпроизводных флуоресцеина в водных растворах, по данным наиболее надежных публикаций, близки к 10^5 л моль⁻¹ см⁻¹. Так, значения λ_{\max} ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$) для препаратов эритрозина и бенгальского розового Б, очищенных при помощи гель-хроматографии, составили 526.5 (90.0) и 548.5 (103.5) [268]. Нами получены значения соответственно 525 (94.6) и 548 (100) [243,324,325].

По данным различных авторов значения pK_{a0} , определенные при помощи спектрофотометрического метода в системе $H_2O - H_2SO_4$, в шкале H_0 составляют: -4.75 для бенгальского розового Б [151], -5.20 для 2,4,5,7,3',4',5',6'-октабромфлуоресцеина [59], -4.70 для флоксина Б [59], -2.3 и -2.60 для эозина [137,145].

Нами найдены следующие значения [243,250]: -5.58 ± 0.08 для бенгальского розового Б, -2.86 ± 0.19 для бенгальского розового А, -2.37 ± 0.11 для эритрозина, -2.64 ± 0.06 для флоксина А и -2.03 ± 0.03 для эозина. Имеются также данные о протонировании этих гидроксиксантенов в системах $H_2O - HClO_4$ и $H_2O - HCl$ [243,250].

В концентрированной водной щелочи эозин может претерпевать два рода превращений: обесцвечивание, связанное с присоединением иона OH^- к центральному атому углерода [122], а также появление полосы поглощения в области 600 нм [122,326]. Последнее явление, наблюдавшееся и в наших работах [243,327], следует объяснить, как и для флуоресцеина, размыканием пиринового кольца (см. выше).

Неводные растворы. Определенные нами значения pK_a представлены в таблицах 7-16.

Таблица 8. Параметры равновесия флуоресцеиновых красителей в 90%-ном (по массе) водном ацетоне, 25 °C [256,279-282,291,295]^a

Соединение	pK_{a1}	pK_{a2}	$\lg(K_{a1}/K_{a2})$	$E_{\max}(H_2R) \cdot 10^{-3}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹
Флуоресцеин	12.5	11.2	-1.3	0.014
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	10.9	11.6	0.7	0.50
2,7-Дихлорфлуоресцеин	10.3	10.4	0.1	0.243
Эозин	6.4	10.0	3.6	1.38
Флоксин А	6.3	10.0	3.7	0.72
Эритрозин	5.9	10.1	4.2	4.18
Бенгальский розовый А	5.7	10.0	4.3	3.48
Бенгальский розовый Б	6.8	7.7	0.9	0.26
Родол	4.05 ^б	11.76 ^б	7.7 ^г	0.307 ^д
N,N-Диэтилродол	4.42 ^б	11.41 ^б	7.0 ^г	0.660 ^д

^a Погрешность определения pK_a в среднем ± 0.1 . ^б pK_{a0} . ^в pK_{a1} . ^г $\lg(K_{a0}/K_{a1})$. ^д $E_{\max}(HR) \cdot 10^{-3}$.

Таблица 9. Параметры равновесия флуоресцеиновых красителей в 52%-ном (по массе) водном ацетоне, 25 °C [255,257,277,295]^a

Соединение	pK_{a1}	pK_{a2}	$\lg(K_{a1}/K_{a2})$	K_T
Флуоресцеин	8.15	8.59	0.4	117
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	7.17	7.22	0.05	52 ^б
2,7-Дихлорфлуоресцеин	7.0	7.8	0.8	47
Эозин	4.14	6.92	2.78	8.2
Эритрозин	3.52	7.25	3.73	2.2
Бенгальский розовый Б	4.35	5.40	1.05	52 ^б

^a Погрешность определения pK_a : от ± 0.05 до ± 0.2 . ^б $K'_T = 0.59$; $K''_T = 0.88$. ^в Если $E_{\max}(III) = 10 \cdot 10^3$, то $K_T = 21$.

Таблица 10. Параметры равновесия хлорпроизводных флуоресцеина в системе вода–ацетон, 25 °С [257]

Масс. доля ацетона, %	2,7-Дихлорфлуоресцеин		3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
0	4.00 ± 0.10	5.19 ± 0.06	3.65 ± 0.05	6.55 ± 0.02
8	—	—	4.37 ± 0.06	6.56 ± 0.03
16	5.0 ± 0.6	5.5 ± 0.3	—	—
33	6.03 ± 0.04	6.40 ± 0.04	—	—
52	7.0 ± 0.1	7.8 ± 0.2	7.17 ± 0.08	7.22 ± 0.08
73	8.6 ± 0.2	8.4 ± 0.1	—	—
90	10.3 ± 0.3	10.4 ± 0.2	10.9 ± 0.4	11.57 ± 0.07

Имеющиеся литературные данные немногочисленны. Так, значения pK_{a1} и pK_{a2} эозина в метаноле, этаноле и пропаноле-2, найденные потенциометрическим титрованием, составили соответственно 7.24 и 9.24, 7.68 и 10.24 и 8.20 и 11.60 [145]. Этим же методом в 90 %-ном (по объему) водном метаноле значения pK_{a1} и pK_{a2} эозина найдены равными 6.5 и 8.65, в то время как спектрофотометрический метод дал значения 6.7 и 8.6, соответственно [145].

В смесях воды с 1,4-диоксаном были определены константы диссоциации серии галоген-производных флуоресцеина [138], эозина, бенгальского розового Б и их производных [161], а также 4'-иодацетамидоэозина [159]. Некоторое представление о согласованности имеющихся данных дает сравнение результатов для эозина. При массовой доле 1,4-диоксана 40 % значения pK_{a1} и pK_{a2} найдены равными соответственно 4.45 и 6.02 [138], причем прямые указания о стандартизации шкалы $pK_{H^+}^*$ отсутствуют, а ионная сила определяется составом буферных растворов.

Таблица 11. Значения pK_a красителей в смеси воды с *n*-бутанолом при массовой доле *n*-C₄H₉ОН 82 % (25 °С) [311,320]

Соединение	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}
Флуоресцеин	1.18 ± 0.05	8.5 ± 0.1	9.6 ± 0.2
Сульфифлуоресцеин	—	4.39 ± 0.06	9.46 ± 0.10
Этилфлуоресцеин	2.68 ± 0.02	8.44 ± 0.07	—
<i>n</i> -Децилфлуоресцеин	2.53 ± 0.02	8.56 ± 0.03	—
Эозин	—	4.95 ± 0.09	8.33 ± 0.04
Этилэозин	—	3.71 ± 0.05	—
<i>n</i> -Децилэозин	—	3.86 ± 0.04	—

Таблица 12. Значения λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль⁻¹ см⁻¹) флуоресцеина и эозина в водно-бутанольной смеси с массовой долей *n*-бутанола, равной 82%, и в чистом *n*-бутаноле [311]

Ионная форма	Флуоресцеин		Эозин	
	82% <i>n</i> -C ₄ H ₉ ОН	100% <i>n</i> -C ₄ H ₉ ОН	82% <i>n</i> -C ₄ H ₉ ОН	100% <i>n</i> -C ₄ H ₉ ОН
H ₃ R ⁺	444 (63.6)	445 (60)	—	—
H ₂ R	458 (0.838); 486 (0.750)	455 (0.567); 475	475 (4.08); 505 (3.17)	475 (4.08)
HR ⁻	458 (28.0); 486 (24.8)	460; 480	533 (63.2)	535 (93)
R ²⁻	499 (92.8)	505 (94)	523 (104.0)	528 (101)

Значения K_T в 82 %-ном и 100%-ном *n*-C₄H₉ОН: для флуоресцеина соответственно 32 и 52, для эозина соответственно 4.9 и 5.0.

Таблица 13. Показатели термодинамических констант диссоциации красителей в 64 %-ном (по массе) водном 1,4-диоксане и значения λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль⁻¹ см⁻¹) красителей [243,290]

Соединение	pK_{a0} pK_{a1} pK_{a2}			λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹)			
				катион	молекула	моноанион	дианион
Флуоресцеин	0.78 ± 0.04	9.45 ± 0.09	9.53 ± 0.22	440 (55.5)	430 _{пл.} , 455 (0.184), 487 (0.137)	455 (31.8), 478 (31.4)	499 (87.4)
Сульфофлуоресцеин	—	4.58 ± 0.08	9.58 ± 0.12	—	445 (48.2)	460 (28.3), 485 (25.1)	505 (76.5)
6-Гидрокси-9-фенилфлуорон	2.71 ± 0.10	8.13 ± 0.12	—	445 (59.2)	455 (29.0), 487 (24.4)	507 (89.4)	
2,7-Дихлорфлуоресцеин	—	8.05 ± 0.03	8.24 ± 0.12	—	465 (0.609), 490 (0.555)	520 (45)	510 (84)
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	—	8.82 ± 0.06	9.20 ± 0.11	—	465 (2.67), 490 (2.36)		
Эозин	—	5.24 ± 0.01	8.57 ± 0.17	—	450 _{пл.} , 475 (2.13), 500 _{пл.}	532 (92)	523 (106)
Этилэозин	—	4.03 ± 0.03	—	—	480 (24)	535 (105)	—
Эритрозин	—	4.92 ± 0.07	8.45 ± 0.16	—	480-485 (6.62)	540-541 (98.5)	530 (112)
Бенгальский розовый Б	—	5.79 ± 0.04	6.97 ± 0.04	—	495-505 (0.42)	565 (100)	555 (105)
Родамин Б	5.94 ± 0.05	—	—	560 (113.2)	549 (84.7)	—	—

В 40 %-ном (по массе) водном 1,4-диоксане [138] значения λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$) для ионов H_3R^+ и R^{2-} равны: 449 (56) и 511 (98.1) для 2,7-дихлорфлуоресцеина, 455 (48.1) и 519 (87.5) для 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина, 456 (45) и 524 (97.5) для эозина; для иона R^{2-} эритрозина: 535 (101).

Таблица 14. Значения pK_a , λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль⁻¹ см⁻¹) и констант таутомерного равновесия красителей в ДМФА [296]^а

Соединение	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	анион R^{2-} ^б	катион	нетральная форма	K_T
Флуоресцеин	0.3 ± 0.1 ^б	14.6 ± 0.3	14.8 ± 0.3	520.5 (116) ^{г,д,е,ж,з}	≈ 450 (55)	455 (0.029)	1033
N,N-Диэтилродол	3.2 ± 0.2	12.6 ± 0.1	—	517 (21.3) ^и	525 (42.7)	525 (0.773)	32
Родамин Б	6.5 ± 0.1	—	—	—	560 (95.7)	537 (0.945)	100 ^к
2,7-Дихлорфлуоресцеин	<-1 ^л	10.4 ± 0.2	13.2 ± 0.1	526 (89.6) ^м	≈ 450 (78) ^и	470 (0.38)	≈ 70
Эозин	— ^о	7.1 ± 0.1	12.4 ± 0.3	529.4 (122) ^{п,р}	≈ 545	480 (1.5)	15
Этилэозин	— ^о	3.6 ± 0.1 ^с	—	—	—	—	—

^а Растворитель содержит 0.013 М Н₂О, 0.04 М СН₃ОН и 1.5 об. % бензола. ^б В случае оксиксантенов спектры R^{2-} , представленные в таблице, измерены в присутствии NH(C₂H₄NH₂)₂, 0.4–0.05 М. ^в Рассчитано из измерений в области $pa_{H^+}^*$ 1.68–2.87. ^г В ДМФА с добавкой КОН и 18-краун-6: 516.5 (108). ^д В присутствии 2 об. % воды, 0.004 М NaOH: 515.5 (104). ^е В растворах NEt₄OH, в присутствии 0.04 М СН₃ОН и 1.5 об.% бензола: 514 (90). ^ж В воде: 490 (88). ^з По литературным данным, в ДМФА с добавкой 0.1–0.5 М триэтиламина: 519 (106 ± 5) [16]; в ДМФА с добавкой КОН (1.7·10⁻⁴ М): 517.6 [202]. ^и R^- . ^к $K_T^{//}$. ^л Значения lg{[H₂R]/[H₃R⁺]} в 1.8, 3.6 и 5.4 М растворах H₂SO₄ в ДМФА равны 1.57, 1.15 и 0.32, соответственно. ^м В воде: 501.5 (75). ^н В 7–9 М растворах H₂SO₄ в ДМФА. ^о Значение $pK_{a,0}$ лежит в сильноокислой области. ^п В растворах NEt₄OH, в присутствии 0.04 М СН₃ОН и 1.5 об.% бензола: 529 (98). ^р В воде: 515 (96.7). ^с Рассчитано из измерений в области $pa_{H^+}^*$ 2.43–2.87.

Таблица 15. Параметры ионных равновесий красителей в 91.3 %-ном водном ДМСО [286-289]

Соединение	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	λ_{\max} , нм		$\Delta\lambda_{\max}$, нм	$E_{\max} (H_2R) \cdot 10^{-3}$	K_T
				R^{2-}	HR^-	R^{2-}		
Флуоресцеин	-0.51 ± 0.01	10.33 ± 0.03	8.98 ± 0.08	513	460	22	0.051	587
Сульфифлуоресцеин	—	3.16 ± 0.11	9.04 ± 0.04	520	457	25	57	—
6-Гидрокси-9-фенилфлуорон	2.40 ± 0.05	8.01 ± 0.02	—	520 ^а	460 ^б	28 ^а	30 ^б	—
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	—	9.2 ± 0.1	8.8 ± 0.1	531	465	23	2.21	9.8
2,7-Дихлорфлуоресцеин	—	7.70 ± 0.04	7.77 ± 0.03	522	533	19	0.334	71
Эозин	—	3.90 ± 0.05	7.81 ± 0.05	527	540	12	2.39	9.0
Этилэозин	—	2.41 ± 0.08	—	540 ^а	480 ^б	20 ^а	24.0 ^б	—
Эритрозин	—	3.62 ± 0.10	7.92 ± 0.07	535	550	10	10.10	1.4
Бенгальский розовый А	—	3.45 ± 0.10	7.77 ± 0.05	537	550	12	9.06	1.6
Бенгальский розовый Б	—	3.85 ± 0.02	5.72 ± 0.06	563	570	14	0.822	28
Родамин Б	5.60 ± 0.02	—	—	505 ^в	565 ^г	-49 ^в	1.80 ^г	59 ^д
<i>N,N</i> -Диэтилродол	3.23 ± 0.02	9.46 ± 0.13	—	515 ^а	527 ^б	-5	0.603 ^б	87
Карбэтокси- <i>N,N</i> -Диэтилродол	5.62 ± 0.15	—	—	530 ^в	525 ^г	—	53 ^в	—

^а Для формы R^{2-} . ^б Для формы HR^- . ^в Для формы R . ^г Для формы HR^+ . ^д $K_T^{//}$.

Таблица 16. Параметры ионных равновесий красителей в метиловом спирте [242,243,256,301]

Соединение	pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹)				K_T
				катион	молекула	моноанион	дианион	
Флуоресцеин	3.1 ± 0.2	10.6 ± 0.2	11.5 ± 0.2	442 (76.1)	455 (0.495)	450 ± 5 (27.3) 480 ± 5	495 (94.0)	54.2
Сульфофлуоресцеин	—	5.3 ± 0.2	11.26 ± 0.04	—	445 (65)	455 (32), 485	503 (90)	—
Этилфлуоресцеин	5.23 ± 0.10	9.96 ± 0.06	—	445 (64.2)	455 (32.7)	505 (95.7)	—	—
6-Гидрокси-9-фенилфлуорон	5.14 ± 0.03	10.25 ± 0.10	—	442	455 (30)	502	—	—
Диэтилфлуоресцеин	4.79 ± 0.03	—	—	444	460	—	—	—
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	≈ 0.8	9.60 ± 0.08	10.39 ± 0.04	460 (73.9)	460 (0.848)	465 (26.6)	518 (90.0)	30
2,7-Дихлорфлуоресцеин	1.49 ± 0.10	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.2	455 (44.9)	459 (0.932)	512 (74.6)	508 (83.3)	27
Эозин	—	6.9 ± 0.1	9.2 ± 0.2	—	475 (3.33)	527-530 (81.3)	521 (98.0)	6.4
Этилэозин	—	5.53 ± 0.06	—	—	475 (24.8)	531 (104)	—	—
Эритрозин	—	6.55 ± 0.09	9.55 ± 0.08	—	480 (11.52)	535-537 (79.0)	530 (103.2)	1.2
Бенгальский розовый А	—	6.40 ± 0.04	9.67 ± 0.12	—	487 (10.37)	537 (92.0)	530 (97.3)	1.4
Бенгальский розовый Б	—	7.3 ± 0.2	8.3 ± 0.2	—	490 (0.478)	558-562 (92.5)	557 (97.4)	49
Родамин Б	7.42 ± 0.04	—	—	552 (111)	545 (100)	—	—	0.1 ^а
Родамин S (сукцинилродамин Б)	7.98 ± 0.07	—	—	545	542	—	—	<0.1 ^а
Родол	6.85 ± 0.05	9.96 ± 0.15	—	482 (31.4)	480 (12.6)	497 (46.4)	—	6.6 ^б
N,N-Диэтилродол	7.1 ± 0.1	9.4 ± 0.1	—	520 (40)	520 (74)	—	—	1.3 ^в
Карбэтокси-N,N-Диэтилродол	7.92 ± 0.09	—	—	518 (35.5)	523 (65.8)	—	—	—
Фенолфталеин	—	—	14.86 ± 0.04	—	—	—	558 (2.49)	—

^а $K_T^{//}$. ^б $K_T^{/}$ = 3.7. ^в $K_T^{/}$ = 1.3.

В другой работе [161] для эозина в 50 %-ном 1,4-диоксане найдено: $pK_{a1} = 3.75$, $pK_{a2} = 6.25$; пересчет в шкалу $pa_{H^+}^*$ и к $I \rightarrow 0$ приводит к значениям $pK_{a1} = 4.2$, $pK_{a2} = 7.3$. Для 4'-иодацетамидозина в 40 %-ном 1,4-диоксане термодинамические оценки составляют $pK_{a1} = 3.5$, $pK_{a2} = 6.0$ [159]. В этой работе результаты представлены в виде графиков зависимости pK_a от состава растворителя; интерполяция этих данных приводит к значениям $pK_{a1} = 5.1$ и $pK_{a2} = 8.1$ в 64 %-ном 1,4-диоксане, что ориентировочно согласуется с полученными нами значениями для эозина в этом смешанном растворителе (табл. 13).

В работе М. Шибаты с соавторами [138] были найдены также значения pK_{a1} и pK_{a2} эритрозина в 40%-ном водном 1,4-диоксане, равные 4.54 и 5.88 соответственно, что близко к значениям для эозина, а также значения $pK_{a1} = 6.40$ и $pK_{a2} = 7.13$ для 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина, что несколько ниже, чем для флуоресцеина. Те же закономерности наблюдаются и в 64%-ном 1,4-диоксане (табл. 13). Но для 2,7-дихлорфлуоресцеина, флоксина А и флоксина Б этими исследователями было найдено лишь по одному значению pK_a : 6.02, 4.22 и 4.25, соответственно, и при этом предполагалось, что $pK_{a1} = pK_{a2}$ [138].

Для эозина, как и для других 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных, красное смещение полосы моноаниона HR^- относительно полосы дианиона R^{2-} наблюдается и в водно-органических смесях (рис. 14).

В то же время, аналогично смещена относительно спектра дианиона R^{2-} эозина полоса поглощения аниона этилэозина R^- в том же растворителе (рис. 15).

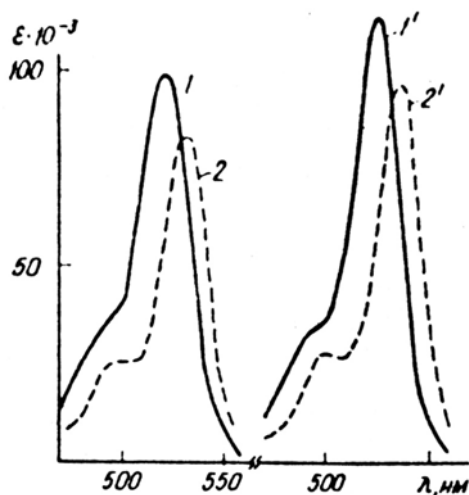


Рис. 14. Спектры ионов R^{2-} (1,1') и HR^- (2,2') эозина в 52 %-ном (1,2) и 90 %-ном (1',2') водном ацетоне [295].

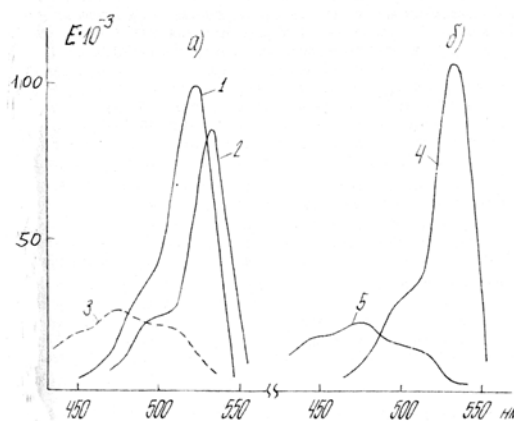
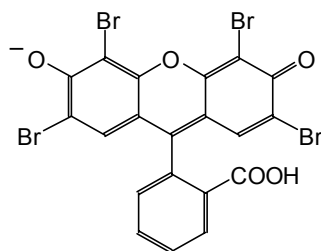


Рис. 15. Спектры поглощения ионных и молекулярных форм эозина (1-3) и этилэозина (4,5) в 52 %-ном (по массе) водном ацетоне: 1 – R^{2-} ; 2 – HR^- ; 3 – H_2R (интенсивность на графике увеличена в 10 раз); 4 – R^- ; 5 – HR [243,295,327].

Таким образом подтверждается предположение о характере влияния отрицательного заряда в 9-арильном заместителе на значение λ_{max} анионного ксантенового хромофора. Такой эффект наблюдался нами во всех исследованных растворителях; например, в этиловом спирте значения λ_{max} для аниона R^- этилэозина, моноаниона HR^- эозина и дианиона R^{2-} эозина составляют соответственно 538 нм, 535 нм и 528 нм [285]. По интенсивности все эти три полосы сходны. Это позволяет моноаниону HR^- эозина в растворах приписать строение типа VI.



Вообще, в случае 2,4,5,7-тетрагалогенопроизводных таутомер типа VI преобладает над таутомером типа V во всех растворителях, о чем говорит красное смещение полосы моноаниона HR^- относительно полосы дианиона R^{2-} (рис. 16-19). В случае флуоресцеина, 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина и сульфофлуоресцеина моноанионы диссоциированы по карбоксильной (сульфо-) группе.

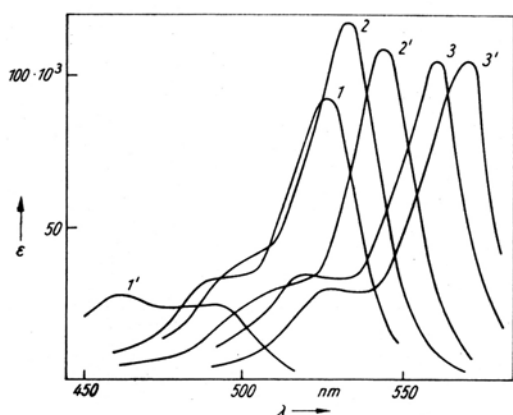


Рис. 16. Спектры поглощения ионов R^{2-} (1-3) и HR^- (1'-3') 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина (1,1'), эритрозина (2,2') и бенгальского розового Б (3,3') в 90%-ном (по массе) водном ацетоне [281,282].

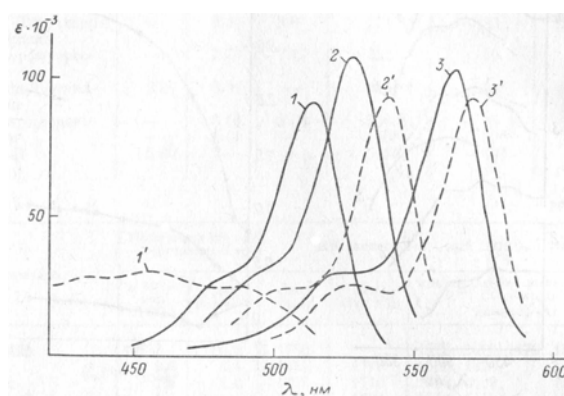


Рис. 17. Спектры поглощения ионов R^{2-} (1-3) и HR^- (1'-3') флуоресцеина (1,1'), эозина (2,2') и бенгальского розового Б (3,3') в 91 %-ном (по массе) водном ДМСО [287].

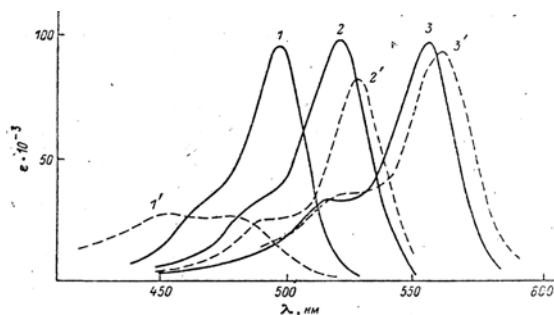


Рис. 18. Спектры поглощения ионов R^{2-} (1-3) и HR^- (1'-3') флуоресцеина (1,1'), эозина (2,2') и бенгальского розового Б (3,3') в метаноле [242].

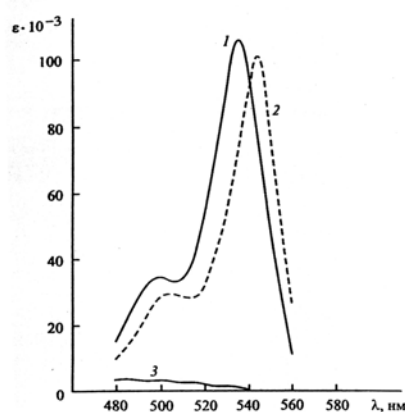


Рис. 19. Спектры поглощения бенгальского розового Б в 64 %-ном (по массе) водном 1,4-диоксане: 1 – R^{2-} ; 2 – HR^- (рассчитан из спектра при $p_{H^+}^* = 6.1$ и $I = 0.004$ М); 3 – H_2R (интенсивность на графике увеличена в 15 раз) [325].

Хотя в видимой области узкие полосы дианионов типа VII в результате протонирования ($COO^- \rightarrow COOH$) и претерпевают небольшой батохромный сдвиг, увеличивающийся при переходе от воды к спиртам и особенно к апротонным (не являющимся донорами водородной связи) растворителям, характер светопоглощения частиц типа VI и VII в целом аналогичен.

Значения показателей микроконстант диссоциации эозина $pK_{1,OH}$ и $pK_{2,COOH}$, представленные в табл. 7, носят вполне разумный характер. Первое значение всегда несколько выше соответствующего значения для этилэозина, второе – несколько выше, чем $pK_{1,COOH}$ флуоресцеина. Значения эффектов среды, $\Delta pK_{1,OH}$ и $\Delta pK_{2,COOH}$, также согласуются с типами зарядов кислотно-основных пар и с природой функциональных групп.

Значения pK_p^Q красителей эозина и бенгальского розового Б, найденные в 50 об. % водном 1,4-диоксане [161], соответствующие значениям $pK_{1,OH}$ в наших обозначениях, практически совпадают с соответствующими значениями для модельных соединений, в качестве которых использованы сложные эфиры и продукты декарбоксилирования [161]. Хуже совпадают значения pK_c^Q красителей и их простых эфиров [161], что может быть связано с переоценкой доли анионов-лактонов для этого вида модельных соединений.

Для 2,7-дихлор- и 4,5-дибромфлуоресцеина таутомерное равновесие [«карбоксилат» (V) \rightleftharpoons «фенолят» (VI)] носит промежуточный характер, и оба таутомера могут в определенных условиях существовать в растворе в соизмеримых количествах. В частности, при переходе от воды к органическим растворителям в случае 2,7-дихлорфлуоресцеина [242,257] и 4,5-дибромфлуоресцеина [314] наблюдается изменение электронного спектра поглощения формы HR^- , что является признаком сдвига положения таутомерного равновесия (V) \rightleftharpoons (VI) вправо (рис. 20):

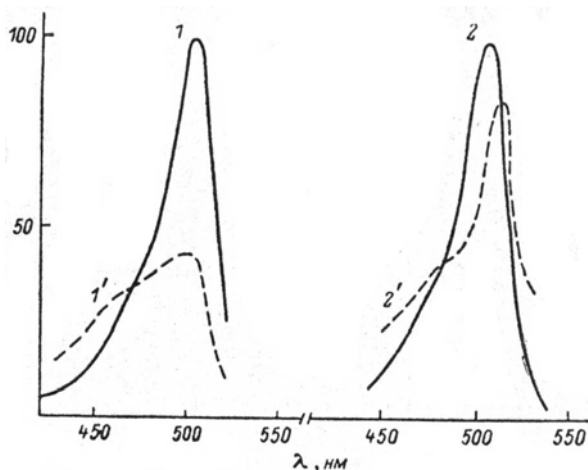
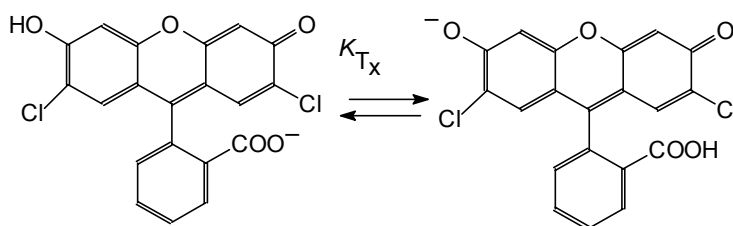


Рис. 20. Спектры поглощения дианиона R^{2-} (1,2) и моноаниона HR^- (1',2') 2,7-дихлорфлуоресцеина в воде (1,1') и в метаноле (2,2'); спектры нормализованы по максимуму поглощения иона R^{2-} в соответствующем растворителе [242].



Уравнение (28) позволяет предвидеть такой сдвиг таутомерного равновесия моноанионов HR^- , поскольку при переходе от воды к неводным средам кислотность карбоксильных групп падает более резко, чем гидроксигрупп. Поскольку при прочих равных условиях при переходе от воды к неводному растворителю $\Delta pK_{COOH} > \Delta pK_{OH}$, то рост K_{Tx} и сдвиг положения равновесия вправо вполне объясним.

Именно поэтому перенесение на неводные среды представлений, развитых лишь для водных растворов, может вести к путанице. Так, авторы, использовавшие 2,7-дихлорфлуоресцеин в качестве пробы для контроля локальной кислотности в обращенных мицеллах Аэрозоля ОТ в гептане, с небольшим количеством воды [162], интерпретировали спектральные эффекты, предполагая существование только одного таутомера моноаниона (V), как в обычных водных

растворах. Гиперхромный эффект и гипсохромный сдвиг полосы от 513 нм к 503 нм при увеличении содержания воды в мицеллярном растворе объяснен увеличением полярности окружения иона R^{2-} [162].

Однако наблюдавшиеся в обсуждаемой работе спектры можно объяснить иначе, если допустить, что краситель при малых содержаниях воды существует в растворе виде иона HR^- (VI), для которого значение λ_{max} выше, чем у дианиона, и что только дальнейшее разбавление водой в безбуферной системе привело к появлению дианиона R^{2-} . В пользу такой интерпретации говорит и рисунок 2 в обсуждаемой публикации [162], представляющий собой типичную картину протонирования иона R^{2-} 2,7-дихлорфлуоресцеина в органических растворителях и 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина в любых средах.

Недавно были описаны протолитические свойства впервые синтезированных фторпроизводных флуоресцеина [201]. Впрочем, представленные в этой работе значения pK_a красителей в воде трудно интерпретировать. Во-первых, красители рассматривались как одноосновные кислоты. Во-вторых, оценки pK_a получены из зависимостей интенсивности флуоресценции от pH. В-третьих, в качестве стандартного вещества, взятого для сравнения, используется флуоресцеин, для которого значение pK_a в воде принимается равным 6.5. Это значение соответствует диссоциации гидроксильной группы моноаниона V; для красителей же, содержащих атомы фтора в кольцах резорцина, возможно частичное существование моноанионов HR^- в виде таутомеров типа VI, а для 2,4,5,7,3',4',5',6'-октафторфлуоресцеина моноанион почти наверняка существует в виде такого таутомера. В этом случае pK_{a2} отвечает диссоциации карбоксильной группы, а экспериментально наблюдается, скорее всего, переход от формы H_2R к R^{2-} .

Спектры поглощения красителей в безбуферных системах. Варьирование состава растворителя (например, в смесях CCl_4 – спирт или 1,4-диоксан – вода) приводит к сложным изменениям электронных спектров поглощения как для флуоресцеина [115,120,121,328,329], так и для эозина [122,123,134,328]. В подобных случаях могут происходить одновременно изменения констант кислотно-основных и таутомерных равновесий, а также изменения спектров поглощения отдельных частиц, например, ионов R^{2-} . Ошибки, возникающие при таком подходе, подробно разобраны нами в специальных статьях [221,232].

Варьирование концентрации гидроксиксантовых красителей в водных [228], водно-органических [229] и безводных [230] растворах также приводит к сдвигу положений протолитических равновесий, как было показано нами [221,232]. Например, изменение электронных спектров поглощения эритрозина в этаноле, происходящее при варьировании концентрации красителя, было объяснено полимеризацией красителя [231]. Однако наши данные как для этанола, так и для ацетона (рис. 21, 22) убедительно доказывают, что речь должна идти о смещении положения кислотно-основных равновесий эритрозина при разбавлении ($H_2R \rightarrow HR^- \rightarrow R^{2-}$), в соответствии с классическим законом разведения Оствальда.

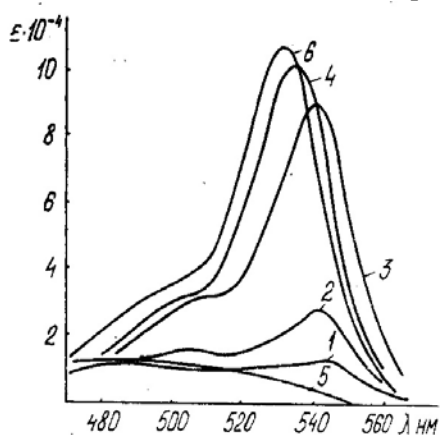


Рис. 21. Спектры поглощения эритрозина в этаноле при различных концентрациях красителя: 1 – $9.28 \cdot 10^{-4}$ М; 2 – $7.31 \cdot 10^{-5}$ М; 3 – $9.21 \cdot 10^{-6}$ М; 5 – $(5.76-73.1) \cdot 10^{-6}$ М, 0.36 М H_2SO_4 ; 6 – $(5.76-73.1) \cdot 10^{-6}$ М, 0.002 М NaOH [232].

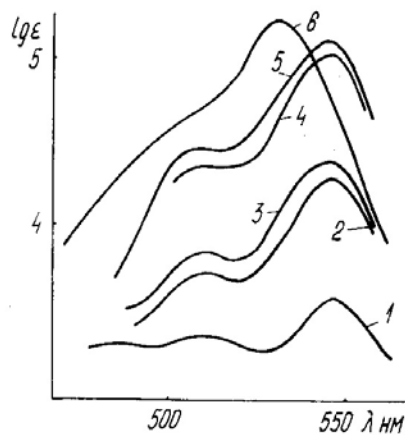


Рис. 22. Спектры поглощения эритрозина в ацетоне при различных концентрациях красителя: 1 – $2.31 \cdot 10^{-3}$ М; 2 – $2.31 \cdot 10^{-4}$ М; 3 – $1.58 \cdot 10^{-4}$ М; 4 – $2.31 \cdot 10^{-5}$ М; 5 – $2.31 \cdot 10^{-6}$ М; 6 – $2.31 \cdot 10^{-5}$ М, $1 \cdot 10^{-4}$ М NaOH [232].

Вполне возможно, что спектры 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина в спиртах, ацетоне и других неводных растворителях, представленные в ранних работах [67], характеризуют не только и не столько ионы R^{2-} , сколько ионы HR^- . Спектры последних сходны со спектрами дианионов, но все же не совпадают с ними.

Ошибочно также и отнесение полосы, смещенной в красную область по отношению к спектру дианиона R^{2-} , не к моноанионной, а к нейтральной форме H_2R [75,330].

С другой стороны, выводы о сольватохромии дианионов R^{2-} 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина в небуферных средах [236,238] могут быть искажены частичным превращением дианионов R^{2-} в моноанионы HR^- , имеющие похожие спектры поглощения. Поэтому подобные измерения необходимо проводить в условиях полного превращения красителей в дианионы, что достигается добавкой необходимого количества щелочи или амина. Изменчивость спектров дианионов R^{2-} галогенпроизводных при варьировании состава смешанного растворителя иллюстрирует таблица 17.

Таблица 17. Влияние состава смешанного водно-ацетонового растворителя на полосу поглощения дианиона эритрозина R^{2-} [232] ^a

Объемная доля воды, %	λ_{\max} , нм	$E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹ ^б
100	524-525	94
99	526	94
90	527	100
80	529	104
24	532	118
10	532	120
0.5-0.3	535	131

^a Добавки NaOH обеспечивают полное превращение красителя в форму R^{2-} . ^б Погрешность ± 0.5 %.

Ассоциация анионов красителей с катионами. Выше уже говорилось о спектроскопических исследованиях В. Оствальда, проведенных в водных растворах солей красителей, в том числе и эозина [264]. Природа сопутствующего катиона практически не влияла на положение полосы поглощения. Однако имеются убедительные примеры взаимодействий ионов R^{2-} эозина с катионами лантаноидов, не сопровождающихся изменениями спектров поглощения и даже флуоресценции. Такие взаимодействия проявляются в тушении флуоресценции красителя [331,332]. Найденное отсюда значение константы ассоциации для пары $R^{2-} + Nd^{3+}$ составляет 710 M^{-1} [331,332].

В органических растворителях изменения электронных спектров поглощения и флуоресценции дианионов эозина, эритрозина и других галогенпроизводных флуоресцеина заметнее [39,331-333]; красное смещение полос поглощения и испускания согласуется с представлениями о взаимодействии катионов лантаноидов с группой COO^- [39,331-333]. В работах Т. А. Шахвердова показано, что ассоциация как правило сводится к образованию продуктов состава 1 : 1 ($Ln^{3+} R^{2-}$), причем в диполярных растворителях, не являющихся донорами водородных связей (ДМСО, ДМФА) константы ассоциации могут достигать значения 10^6 M^{-1} и выше [39,331-333]. Этим же автором дана схема равновесия между сольватированными ионами, внешнесферными и внутрисферными комплексами [39,331-333]; комплексы первого вида можно в определенном смысле рассматривать как сольватно-разделенные («рыхлые», «длинные») ионные пары, а второго – как соединения, промежуточные между сольватно-разделенными и контактными («тесными», «короткими») ионными парами.

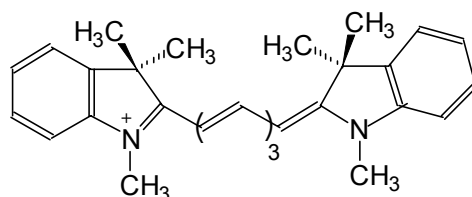
Можно считать доказанным, что явление ассоциации катионов лантаноидов с отрицательно заряженными группировками носит общий характер и проявляется как в случае гидроксиксантенов [36-39,331-333], так и ароматических соединений с группами SO_3^- , в частности – пирен-тетрасульфата [334] и родамина 200 Б (лизамин-родамина RB 200) [39]. Даже цвиттерионы родамина Б и других родаминов, содержащих свободную карбоксильную группу, способны ассоциировать в этаноле с катионами редкоземельных элементов, а также с другими ионами

металлов (Cu^{2+} , Ag^{+}); в этом случае стехиометрия более сложная, чем в случае гидроксиксантенов [335].

В случае родаминов тенденция группы COO^{-} к взаимодействию с катионами Na^{+} , Li^{+} , Ba^{2+} и Mg^{2+} проявилась в раскрытии лактонного цикла в ацетонитриле за счет сдвига равновесия в сторону цвиттериона [336,337]. Нами было недавно показано [338], что эффект раскрытия лактонного цикла под действием ионов La^{3+} в CH_3CN и ДМСО проявляется и в случае дианионов-лактонов нитропроизводных флуоресцеина, о которых речь еще пойдет ниже.

Как недавно было показано, в дихлорметане многозарядные катионы дендримеров ассоциируют с двухзарядными анионами эозина R^{2-} , что проявляется в изменении электронного спектра поглощения последних [193].

Другого рода ассоциаты дианионов R^{2-} гидроксиксантенов образуются в водных растворах при взаимодействии с крупными органическими катионами, с такими, в частности, как катион красителя индотрикарбоцианина



длинноволновая полоса которого испытывает ($\lambda_{\text{max}} = 737$ нм) сильный гипохромный эффект при взаимодействии с различными органическими анионами [339,340]. Катион красителя St^{+} вводится в раствор в виде хлоридов или тетрафторборатов.

Ионы R^{2-} 2,7-дихлорфлуоресцеина и эозина ассоциируют в очень разбавленных водных растворах с катионами индотрикарбоцианина; наиболее вероятный состав ассоциатов: $\text{St}^{+}\text{R}^{2-}$, значения логарифмов констант: 5.3 ± 0.2 и 5.9 ± 0.2 , соответственно [341]. В случае дианиона бенгальского розового Б константа образования ассоциата

$(\text{St}^{+})_2\text{R}^{2-}$ найдена равной 12.43 ± 0.05 [342]. Движущей силой при образовании подобных ассоциатов являются, наряду с электростатическими, также гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Показано также, что в водных растворах анионы эозиновых красителей образуют ассоциаты с катионами четвертичных и бисчетвертичных аммониевых соединений, в том числе таких лекарственных препаратов, как декамина, этония, диадония, кватерона, аминазина и других; наиболее реакционноспособной формой являются в этом случае моноанионы красителей HR^{-} [343,344].

Таутомерия нейтральных форм галогенпроизводных флуоресцеина. Природа растворителя оказывает влияние на положение таутомерного равновесия нейтральных форм H_2R гидроксиксантеновых красителей. На рисунках 23 и 24 представлены спектры нейтральных форм соответственно в метиловом спирте и в 91 %-ном водном ДМСО. Эти спектральные данные вообще типичны для исследуемой серии соединений; если обесцвечивание нейтральных форм вызвано превращением их в лактонный таутомер типа IV, то расположение красителей в ряд по убыванию значений E_{max} (H_2R) соответствует расположению по значениям K_{T} . Сильнее всего тенденция к образованию лактона проявляется в случае

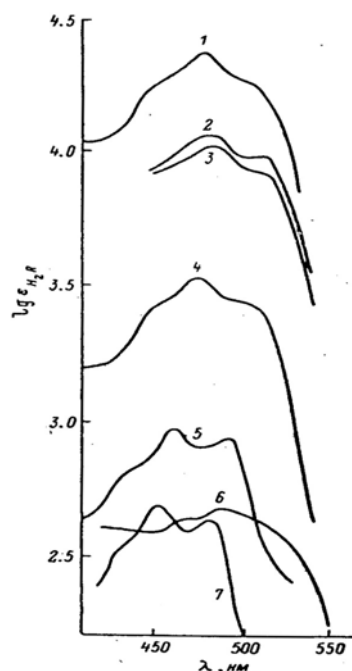


Рис. 23. Спектры поглощения нейтральных форм HR (1) и H_2R (2-7) в метиловом спирте: 1 – этилэозин; 2 – эритрозин; 3 – бенгальский розовый А; 4 – эозин; 5 – 2,7-дихлорфлуоресцеин; 6 – бенгальский розовый Б; 7 – флуоресцеин [242].

флуоресцеина,² слабее всего – в случае эритрозина. Вода нивелирует эти различия до минимума, а в апротонных (не являющихся донорами водородной связи) растворителях эти различия проявляются максимально. Рисунок 25 является в этом смысле типичным; сходный характер имеют зависимости логарифмов констант таутомерного равновесия ($\text{III} \rightleftharpoons \text{IV}$) от состава смешанного растворителя в системах вода-ацетон, вода-этанол и вода-1,4-диоксан [243,296].

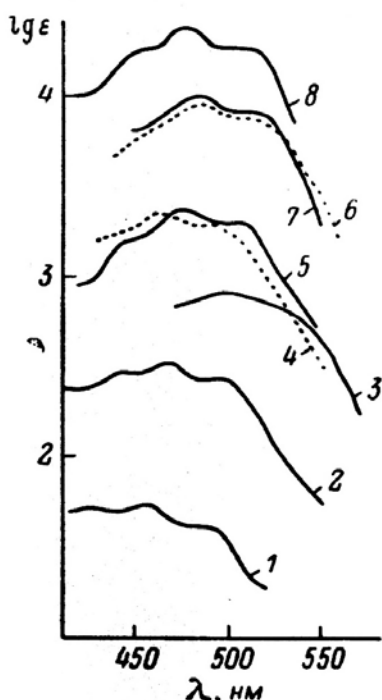


Рис. 24. Спектры поглощения нейтральных форм H_2R (1-7) и HR (8) в 91 %-ном (по массе) водном ДМСО: 1 – флуоресцеин; 2 – 2,7-дихлорфлуоресцеин; 3 – бенгальский розовый Б; 4 – 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеин; 5 – эозин; 6 – бенгальский розовый А; 7 – эритрозин; 8 – этилэозин [287].

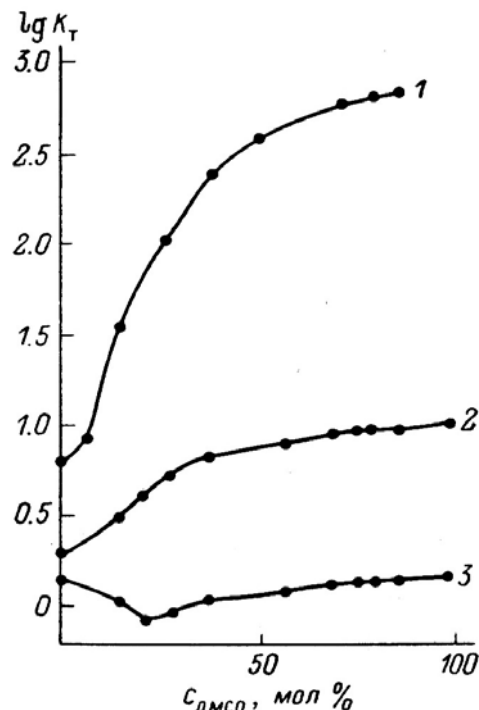


Рис. 25. Зависимость логарифма константы таутомерного равновесия [$\text{III} \rightleftharpoons \text{IV}$] от мольной доли, %, органического соразтворителя в системе ДМСО – вода: 1 – флуоресцеин, 2 – эозин, 3 – эритрозин [287].

Значения энергии Гиббса (в кДж моль⁻¹) таутомеризации нейтральной формы эозина ($\text{III} \rightleftharpoons \text{IV}$) в растворителях различной природы (спирты, хлороформ, ДМФА, смеси воды с этанолом, 1,4-диоксаном, ДМСО и ацетоном) можно описать следующим корреляционным уравнением [243,296]:

$$\Delta G_{\text{ТАУТ}} = -12.3 + 11.74 E_T^{\text{N}}; \quad n = 43; r = 0.890 \quad (29)$$

(здесь, как и в случае флуоресцеина, в пределах одной водно-органической смеси коэффициенты корреляции выше). Экстраполяция к $E_T^{\text{N}} \rightarrow 0$ позволяет предсказать “предельное” значение K_T для эозина: 1.4×10^2 , экстраполяция же к газовой фазе ($E_T^{\text{N}} = -0.11$ [316]) дает значение $K_T = 2.4 \times 10^2$. Таким образом, в вакууме и в неполярном растворителе значения K_T флуоресцеина и эозина различаются на три и два порядка, соответственно, в спиртах уже менее чем на порядок, а вода оказывает еще более сильное нивелирующее действие на таутомеризацию красителей.

В случае гидроксиксантенов, содержащих атомы галогенов в кольцах резорцина, практически полное отсутствие в растворах, особенно в неводных, цвиттерийонных структур типа II объясняется резким усилением кислотности гидроксигрупп по сравнению с группой COOH , в соответствии с ур. (26).

² Но особенно сильно выражена склонность к образованию лактонов у некоторых нитропроизводных флуоресцеина, в частности, у 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина, рассмотренного ниже.

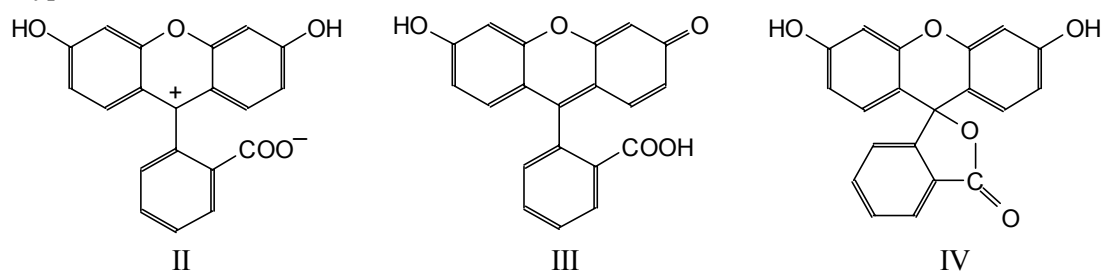
6. Диссоциация красителей в растворах и ИК спектры

До сих пор наши выводы о строении тех или иных форм флуоресцеина и его производных в растворах основывались на электронных спектрах поглощения. Однако в литературе имеется целый ряд работ, в которых строение данных красителей и родственных им соединений в твердом состоянии исследовалось при помощи ИК спектров [49-51,146,345-352] и рентгеноструктурного анализа [353-362]. Что касается растворов красителей, то отдельные исследования, проведенные методом ЯМР [146,358,363-365], в общих чертах подтверждают выводы, сделанные на основании электронной спектроскопии. Уже упоминавшиеся квантово-химические расчеты [19,20,28,209-217] дают некоторое представление о характере распределения зарядов в молекулах и ионах красителей, но, как было показано выше, оценка долей тех или иных таутомеров в растворителях различной природы [218] может быть ошибочной, если используется лишь модель диэлектрического континуума, без учета специфических взаимодействий.

Для выяснения строения красителей в растворах весьма желательно применение колебательной спектроскопии [351,352]. Например, недавнее исследование строения различных форм флуоресцеина в водном растворе методом спектроскопии комбинационного рассеяния света [210] подтвердило существующие представления и, таким образом, показало несовершенство теоретических подходов, не учитывающих специфических взаимодействий (водородных связей) в водных растворах [218].

Имеются данные об ИК спектрах хлороформных экстрактов красителей из водных растворов [351], а также о полосах валентных колебаний карбонильных групп лактонов флуоресцеина и эозина в различных органических растворителях [146]. Но все же проведение широких исследований состояния красителей в растворах ограничено непрозрачностью большинства растворителей в той области ИК спектра, где находятся представляющие главный интерес частоты колебаний молекул и ионов. Выбрав в качестве наиболее подходящего со всех точек зрения растворителя ДМСО, мы заполнили этот пробел, проведя соответствующие исследования в условиях варьирования кислотности среды [286,287,366].³ Но вначале рассмотрим литературные и некоторые наши данные об ИК спектрах флуоресцеиновых красителей в твердом состоянии.

Идентификация различных структур флуоресцеина в твердом состоянии. Уже в первых работах, посвященных синтезу и выделению в индивидуальном виде флуоресцеина и его производных, было обнаружено, что в зависимости от способа выделения из раствора нейтральная форма красителя (в наших обозначениях – H_2R) существует в виде нескольких модификаций [367,368]. Исторический обзор этой проблемы дан в более современных публикациях [10,51,350]. Согласно установившейся в настоящее время точке зрения, существование желтого, красного и бесцветного твердых препаратов флуоресцеина можно объяснить исходя из структур II, III и IV соответственно.



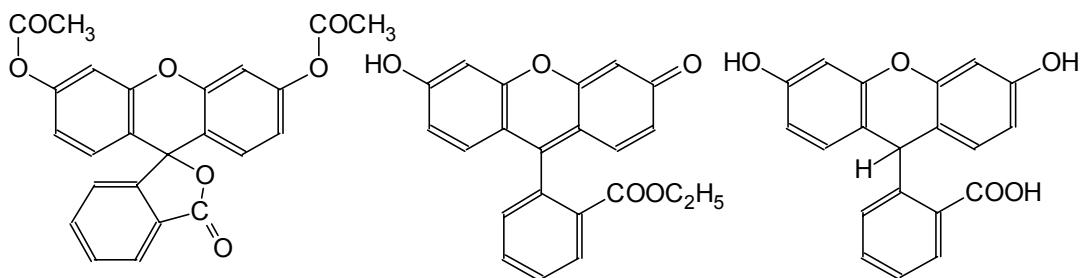
Как было показано в разделах 1-4, электронные спектры поглощения и значения pK_a флуоресцеина в растворах удастся удовлетворительно интерпретировать именно с учетом этих трех таутомеров, находящихся в состоянии подвижного равновесия друг с другом. При растворении препаратов «желтого» и «красного» флуоресцеина в различных растворителях спектральные и электрохимические свойства оказываются настолько сходными [118,121,155,369], что пред-

³ Все ИК спектры исследованы нами совместно с Ю. Н. Суровым.

ставляется разумным небольшие различия отнести за счет эффектов примесей в небуферных системах либо за счет неполного установления равновесия.

Полоса 1729 см^{-1} в ИК спектре твердого препарата флуоресцеина была в работах М. Дэвиса и Р. Джонса [345,346] приписана валентным колебаниям карбонильной группы лактона IV, $\nu(\text{C=O})$, что вполне согласуется с наличием интенсивной полосы 1740 см^{-1} в спектре препарата фенолфталеина, лактонное строение которого общепринято [345,346]. Отсутствие полос 1560 см^{-1} и 1410 см^{-1} , отвечающих $\nu(\text{CO}_2^-)$, исключает цвиттерионную структуру II, а отсутствие интенсивного поглощения ассоциированных групп COOH позволило исключить хиноидную структуру III. К сожалению, в этих работах не описаны условия выделения и внешний вид препарата флуоресцеина [345,346]. Можно предположить, что в препарате преобладал лактон IV, а таутомеры II и III присутствовали в малых или ничтожных количествах.

Первую серьезную попытку выяснить строение желтого и красного флуоресцеина сделали Ю. Скляр и Г. Михайлов [348]. В качестве модельных соединений ими использованы диацетилфлуоресцеин (полоса 1760 см^{-1} отнесена к валентным колебаниям группы C=O лактона; впоследствии высказано предположение, что эта полоса отвечает колебаниям карбонила ацетильной группы [350]), этилфлуоресцеин (полосы 1721 см^{-1} и 1641 см^{-1} отнесены к валентным колебаниям группы C=O карбоксигруппы и хиноида, что впоследствии было подтверждено и в наших опытах [243]), а также флуоресцин, продукт восстановления флуоресцеина (полоса 1706 см^{-1} отнесена к валентным колебаниям группы C=O карбоксильной группы).



В результате желтой модификации приписано цвиттерионное строение II; в спектре желтого препарата, полученного по описанной в литературе методике [367], нет полос в области $1800\text{--}1670\text{ см}^{-1}$. Авторы считают, что красная модификация флуоресцеина также имеет цвиттерионное строение, но является кристаллической, в то время как желтая – аморфная [348].

В другой работе [349] для нейтральных форм флуоресцеина и шести его галогенпроизводных в твердом состоянии найдены полосы $1700\text{--}1760\text{ см}^{-1}$, отнесенные за счет карбонильных групп лактонов. Там же предложено отнесение других полос в ИК спектрах.

Более детальное исследование провели Р. Маркушевский и Х. Диль [350]. Эти авторы выделили в чистом виде из 1,4-диоксана бесцветную лактонную структуру IV, в спектре препарата имеется полоса $\nu(\text{C=O}) = 1730\text{ см}^{-1}$, причем плечо $1760\text{--}1770\text{ см}^{-1}$ отнесено к аддукту $[\text{IV} \cdot 0.57(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2)]$. Красная модификация флуоресцеина, осажденная горячей соляной кислотой из водно-спиртового щелочного раствора, является хиноидом III; полоса 1711 см^{-1} отнесена к $\nu(\text{C=O})$ карбоксильной группы (для бензойной кислоты $\nu(\text{C=O}) = 1690\text{ см}^{-1}$, для катиона родамина Б $\nu(\text{C=O}) = 1715\text{--}1705\text{ см}^{-1}$). Желтой модификации, осажденной при помощи холодной уксусной кислоты, приписана цвиттерионная структура II. В спектре препарата нет полос в области $1800\text{--}1600\text{ см}^{-1}$. Полоса 1536 см^{-1} , имеющаяся также в спектрах солей пирилия, отнесена к антисимметричным колебаниям катионного гетероцикла. Полосы группировки COO^- ($1596, 1461\text{--}1450\text{ см}^{-1}$) перекрыты поглощением ароматических колец [350].

В одновременно появившейся публикации [146] цвиттерионная структура не рассматривается как реально существующая частица; для нейтральных форм флуоресцеина и эозина предполагается лишь хиноидный и лактонный таутомеры. Последние характеризуются значениями $\nu(\text{C=O}) = 1730\text{ см}^{-1}$ и 1755 см^{-1} в твердом состоянии и $\nu(\text{C=O}) = 1750\text{ см}^{-1}$ и 1780 см^{-1} в различных растворителях (ДМСО, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетонитрил) [146]. ИК спектр препарата флуоресцеина, выделенного из водного раствора, не содержит признаков лактонной структуры [146].

Рентгенографическое и ИК спектроскопическое исследование молекулярного комплекса флуоресцеина с метанолом (1 : 1) [355] показало, что краситель имеет лактонное строение, но

по мере удаления метанола происходит постепенное превращение в цвиттерионную структуру, о чем свидетельствует интенсивность полос 1750 см^{-1} и $1540\text{--}1545\text{ см}^{-1}$, соответственно.

В этой же работе были исследованы ИК спектры поликристаллических образцов желтого и красного цвета, выделенные из воды, и красного порошка, выделенного из метанола. В ИК спектрах красных образцов помимо полосы $1690\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, близкой к найденной для хиноидной формы Р. Маркушевским и Х. Дилем [350], имеется полоса 1640 см^{-1} , упоминаемая в работе Д. Фомпеди и П. Левийена [146].

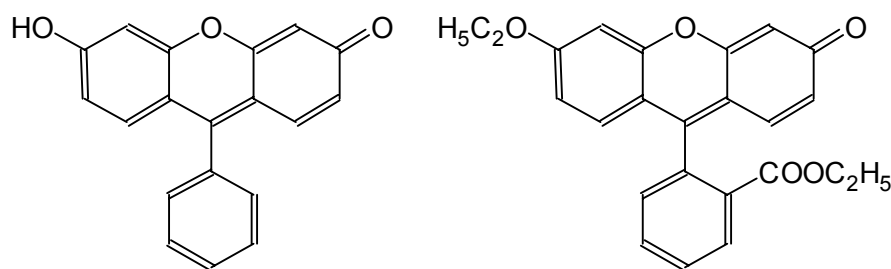
Красные образцы, полученные в различных условиях и из разных растворителей, различаются по рентгенографическим и спектральным параметрам, что может быть связано с влиянием растворителя на кристаллическое строение или наличием нескольких полиморфных модификаций хиноидной формы III [355]. Далее, показано, что небольшие примеси цвиттериона могут окрашивать в желтый цвет бесцветные кристаллы лактона, а образцы, содержащие флуоресцеин в форме II, могут быть окрашены как в светло-желтый, так и в ярко-оранжевый цвет [355]. В свое время оранжевая форма твердого флуоресцеина считалась, наряду с желтой и красной, третьей окрашенной формой, но была исключена после специального исследования [367]. Особенности кристаллической упаковки молекул в твердых образцах флуоресцеина II и III обуславливают различный характер сигналов ЭПР [370]; соотношение этих таутомеров в коммерческом образце оценено как 1 : 8 [370].

Следует учесть, что лактон флуоресцеина превращается со временем, а особенно быстро – при нагревании, в цвиттерион [146,350,355], последний же при нагревании переходит в хиноид [350].

С целью проверки вышеописанных положений нами были проведены некоторые дополнительные исследования; ИК спектры твердых препаратов были измерены в таблетках KBr.

Для твердого препарата диацетильного производного флуоресцеина в твердом состоянии нами получен спектр с очень широкой полосой в области 1765 см^{-1} ; по-видимому, здесь сливается поглощение групп C=O как лактона, так и ацетильных групп. Таким образом, отчасти удастся примирить точки зрения различных авторов на природу этой полосы [348,350]. Имеются также полосы 1612 , 1497 и 1472 см^{-1} (ароматические кольца), 1428 см^{-1} (колебания C-O), а также 1122 , 1106 и 1084 см^{-1} (колебания C-O-C). По форме спектр полностью совпадает с графиком, опубликованным в литературе [347].

ИК спектры хиноидных структур удалось наблюдать на примере этилового эфира флуоресцеина (формулу см. выше), а также 6-гидрокси-9-фенилфлуорона и диэтилфлуоресцеина:



Для этих красителей значения $\nu(\text{C=O})$, отвечающие хиноидным группам, оказались равными 1637 , 1612 и 1642 см^{-1} , соответственно. Таким образом, вполне естественно, что в спектре хиноидного (красного) флуоресцеина имеется полоса 1640 см^{-1} [146,355], хотя, согласно другим данным [350], вследствие высокой степени сопряжения хиноидной группы флуоресцеина вместо обычной полосы в области $1626\text{--}1685\text{ см}^{-1}$ имеется полоса, сливающаяся с поглощением ароматических колец ($1590\text{--}1600\text{ см}^{-1}$). Частоты валентных колебаний карбонила групп COOC_2H_5 для обоих сложных эфиров флуоресцеина найдены нами равными $1720\text{--}1722\text{ см}^{-1}$ [243].

Некоторые из полученных нами ИК спектров представлены на рис. 26.

Спектр нейтральной формы флуоресцеина в ДМСО согласуется с лактонным строением [146,350]. Спектр цвиттериона II нам удалось зарегистрировать для препаратов красителя, выделенных из хлороформа и из воды; в обоих случаях, судя по наличию полос 1735 и 1731 см^{-1} , имеется примесь лактона, впрочем, заметно меньшая во втором случае. Полосу 1537 см^{-1} относим к колебаниям «пирилиевого» гетероцикла [350], полосы 1600 и 1460 см^{-1} – к колебаниям

ароматических колец, а полосу $1372\text{--}1375\text{ см}^{-1}$ – к колебаниям связи «углерод – арил», в соответствии с данными для карбокатионов трифенилметанового ряда [371], подтвержденных нами при исследовании спектров катионов родаминов [294] и цвиттерионов сульфоталеинов [296,372,373] в твердом состоянии и в растворах.

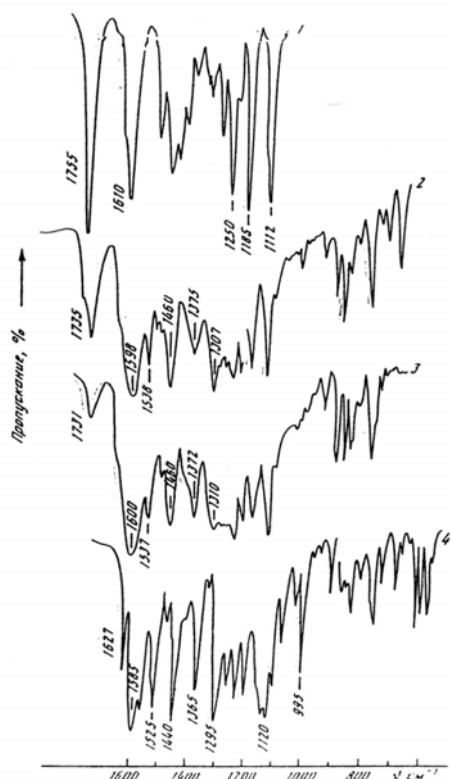


Рис. 26. ИК спектры флуоресцеина (1-3): 1 – раствор лактона IV 99.7 %-ном ДМСО; 2 – твердый препарат, выделенный из хлороформа (смесь таутомеров III и IV); 3 – твердый препарат, выделенный из воды и высушенный при $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ («желтый» флуоресцеин II с примесью лактона IV); 4 – ИК спектр твердого препарата нейтральной формы сульфолуоресцеина, выделенного из воды [366].

полосы $1330\text{--}1300\text{ см}^{-1}$ и $1125\text{--}1100\text{ см}^{-1}$ относятся к колебаниям $\text{C}=\text{O}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ соответственно. Наконец, полосы $1230\text{--}1170\text{ см}^{-1}$ относят к колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ [351]. Все эти данные были получены для твердых препаратов.

ИК спектры выделенных нами из водных растворов твердых препаратов 2,7-дихлорфлуоресцеина, 4,5-дибромфлуоресцеина, 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина, бенгальского розового Б, эозина и эритрозина не противоречат гипотезе о преимущественно лактонном строении; лишь в случае эритрозина характер ИК спектра позволяет сделать вывод о наличии еще и значительных количеств хиноида, о чем говорит полоса валентных колебаний карбонила группы COOH , 1710 см^{-1} (см. также ниже).

Последовательность диссоциации функциональных групп и ИК спектры в ДМСО. Нами были измерены ИК спектры флуоресцеина, его галогенпроизводных и некоторых родственных соединений в ДМСО (кюветы из CaF_2 толщиной 0.005 см). Нейтральные формы существуют в виде бесцветных лактонов, но ввиду того, что рабочие концентрации были очень высокими ($0.01\text{--}0.1\text{ М}$) по сравнению с теми, что использовались в электронной спектроскопии, малые примеси хиноидных таутомеров обуславливали слабую окраску растворов. С другой стороны, использование столь больших концентраций красителей позволяло подавить диссоциацию их

Нейтральная форма сульфолуоресцеина как в твердом состоянии, так и в растворе ДМСО (с добавкой CF_3COOH) существует исключительно в виде цвиттериона. Помимо полосы 1525 см^{-1} наблюдалась полоса 1627 см^{-1} (рис. 26), которую мы также относим к пирилиевому фрагменту [350,374]. «Пирилиевые» полосы $1524\text{--}1542\text{ см}^{-1}$ и $1640\text{--}1646\text{ см}^{-1}$ наблюдаются и в спектрах солей родаминов и пиронинов [243,294,375]. Полосы 1585 , 1555 и 1440 см^{-1} связаны с колебаниями ароматических колец, а 1365 см^{-1} – с колебаниями связи $\text{C}-\text{арил}$. По аналогии с данными для сульфоталеинов [372,373] и родамина 200 Б [375], полосы 1140 и 995 см^{-1} относим к антисимметричным и симметричным колебаниям группы SO_3^- . Таким образом, ИК спектр сульфолуоресцеина подтверждает сведения о цвиттерионе флуоресцеина II.

Для нейтральной формы бенгальского розового Б отмечено существование лактона в твердом состоянии и в хлороформе; значения $\nu(\text{C}=\text{O})$ равны 1778 , 1785 см^{-1} и 1780 см^{-1} , соответственно [351]. Для этого же красителя выделен ряд производных, для которых значения $\nu(\text{C}=\text{O})$ составляют 1770 см^{-1} (лактон), 1730 см^{-1} (этиловый и бензиловый эфиры по карбоксильной группе, натриевые соли), 1780 см^{-1} и 1730 см^{-1} (ацетильное производное сложного этилового эфира), 1780 см^{-1} (диацетильное производное, лактон) [49-51].

Что касается области спектра 1400 см^{-1} и ниже, то здесь отнесение полос нейтральных форм соединений флуоресцеинового ряда не вполне однозначно. Так, в одной из работ полосы $1420\text{--}1005\text{ см}^{-1}$ отнесены к скелету, а 1320 см^{-1} – к группе OH [146]. В другой работе колебания в области $1315\text{--}1110\text{ см}^{-1}$ отнесены к валентным колебаниям связи кислород-углерод, а колебания в области 1370 см^{-1} – к ароматическому скелету [350]. Авторы более ранней работы [349] отнесли полосы 1730 , 1700 и 1300 см^{-1} к колебаниям $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ соответственно.

форм H_2R в диметилсульфоксидных растворах (и катионов HR^+ или даже солей HR^+Cl^- родаминов). Добавками КОН мы добивались превращения гидроксиксантеновых и фталеиновых красителей в анионные формы (а родаминов – в нейтральные формы, существующие в ДМСО практически полностью в виде лактонов). Результаты представлены в таблице 18 и на рис. 27, 28.

Таблица 18. Инфракрасные спектры красителей в ДМСО [243,286,287,294,366,376]
(значения волновых чисел в cm^{-1})

Соединение	ν (C=O) лактон группа COOH	поглощение ароматических циклов ионов R^{2-} , а также ν^{as} и ν^s группы COO ⁻
Флуоресцеин	1755 ^a —	1575, 1476, 1470, 1350
Эозин	1765 ^b 1710	1560, 1470, 1357
Эритрозин	1768 ^b 1710	1549, 1469, 1372, 1355
Бенгальский розовый А	1760 ^г 1694	1546, 1470, 1347
Бенгальский розовый Б	1772 —	1545, 1472, 1349, 1312
3',4',5',6'- Тетрахлорфлуоресцеин	1765 ^д —	1577, 1472, 1352
2,7-Дихлорфлуоресцеин	1766 ^е —	1569, 1496, 1372
Сульфифлуоресцеин	— —	1575, 1469, 1387, 1353
Этилэозин	— 1715 ^ж	1558, 1484, 1354 ^з
Фенолфталеин	1755 —	1568, 1498, 1385, 1365
Родамин Б	1752 ^и 1700	1590, 1466, 1405, 1343 ^к

^a В $CHCl_3$: 1740; твердые препараты, выделенные из хлороформа и воды: 1735 и 1731, соответственно. ^b В $CHCl_3$: 1780, 1774; твердые препараты, выделенные из хлороформа и воды: 1750 и 1754, соответственно. ^г В $CHCl_3$: 1765; твердые препараты, выделенные из хлороформа и воды: 1747 и 1752, соответственно. ^д В $CHCl_3$: 1773; твердые препараты, выделенные из хлороформа и воды: 1750 и 1751, соответственно. ^е В $CHCl_3$: 1772; твердые препараты, выделенные из хлороформа и воды: 1745 и 1761, соответственно. ^ж В $CHCl_3$: 1768; твердые препараты, выделенные из хлороформа и воды: 1732 и 1733, соответственно. ^з Группа $COOC_2H_5$; для этилового эфира родамина Б: 1708 cm^{-1} . ^и ИК спектр аниона R^- . ^к В $CHCl_3$: 1745; в $CHCl_3$ с добавкой хинолина: 1740 [377]; твердый препарат, выделенный из хлороформа: 1752. ^к ИК спектр катиона HR^+ .

ИК спектры лактонов флуоресцеина и родамина Б имеют много общих черт: полосы 1755 и 1752 cm^{-1} , 1610 и 1615 cm^{-1} , 1335 и 1331 cm^{-1} , 1112 и 1124 cm^{-1} , соответственно.

ИК спектры бесцветных лактонов в ДМСО можно, в свою очередь, сопоставить со спектрами нейтральных форм в твердом состоянии. Это сравнение позволяет доказать доминирование лактонов во многих твердых образцах красителей, выделенных из различных растворителей, несмотря на окраску препаратов, вызванную примесями окрашенных таутомеров, вносящих, как теперь видно, несущественный вклад в результирующий колебательный спектр. Это относится, в частности, к препарату нейтральной формы родамина Б, выделенной из хлороформного экстракта [243].

Для эритрозина в спектре нейтральной формы в ДМСО имеются признаки ν (C=O) группы COOH (рис. 28). Для флуоресцеина и даже для эозина такая полоса не проявляется, что согласуется со значениями $lg K_T$ в ДМСО: ≈ 3 , ≈ 1 и ≈ 0 для флуоресцеина, эозина и эритрозина, соответственно (см. рис. 25). В ИК спектре твердого препарата эритрозина, выделенного из водного раствора, примесь хиноидного таутомера также значительна. Вывод о более выраженной тенденции к образованию хиноидного таутомера типа III в случае эритрозина косвенно подтверждается данными работы, в которой проведено кристаллографическое исследование комплекса эритрозина с этанолом [356]. Строение красителя было хиноидным, в то время как флуоресцеин кристаллизуется из ацетона и метанола, согласно кристаллографическим исследованиям других авторов [353,355], в виде лактона.

В случае эозина, эритрозина и бенгальского розового А превращение преобладающей в этом растворителе лактонной формы (IV) нейтральных молекул H_2R в моноанион HR^- при титровании растворов красителей щелочью (рис. 27) приводит одновременно с понижением интенсив-

ности полосы $\text{C}=\text{O}$ лактона ($1765\text{--}1768\text{ см}^{-1}$) к появлению полосы валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ группы COOH ($\approx 1710\text{ см}^{-1}$). Это объясняется появлением таутомеров типа VI.

Последующая нейтрализация по второй ступени приводит к исчезновению полосы $\approx 1710\text{ см}^{-1}$ ввиду диссоциации карбоксильной группы ($\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^-$) на стадии превращения эозина и эритрозина из моноаниона HR^- в дианион R^{2-} . При этом спектр дианиона R^{2-} (существующего в растворе, возможно, отчасти в виде ионных ассоциатов с ионами K^+) становится сходным с ИК спектром серебряной соли Ag_2R соответствующего красителя в твердом состоянии [376]. Имеется также множество аналогичных данных об ИК спектрах динатриевых и дикалиевых солей красителей в твердом состоянии [345,346,349,351,352]. Во всех случаях в растворах дианионов R^{2-} имеются интенсивные полосы в областях $1610\text{--}1545\text{ см}^{-1}$ и $1500\text{--}1470\text{ см}^{-1}$, отнесенные к колебаниям ароматических колец, поляризованных зарядом, и в области $1350\text{--}1385\text{ см}^{-1}$, отнесенные к колебаниям C -арил. Такое отнесение согласуется с данными для трифенилкарбониевых ионов [371]; сходные полосы имеются в спектрах дианионов сульфоталеинов [296] и катионов родаминов и пиронинов [294,366].

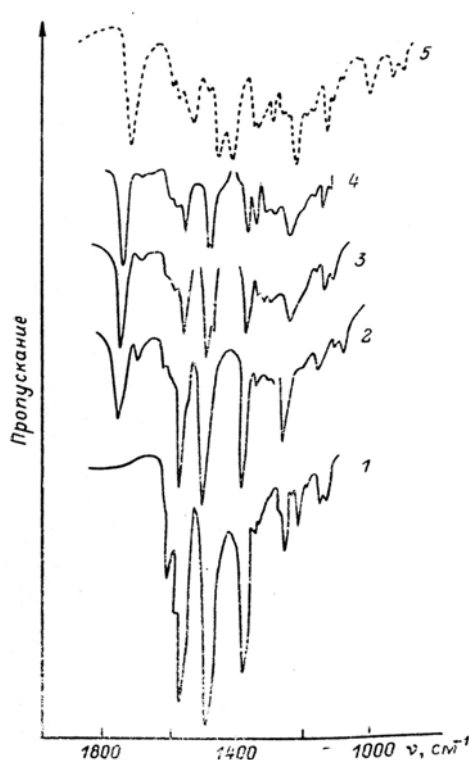


Рис. 27. ИК спектры эозина в 99.7 %-ном ДМСО, концентрация красителя 0.03 М: 1 – 0.1 М КОН (форма R^{2-}); 2 – 0.012 М КОН; 3 – 0.005 М КОН; 4 – в нейтральном растворителе (форма H_2R), 5 – спектр твердого образца эозина, осажденного из водного раствора, в таблетках КВг (форма H_2R) [287].

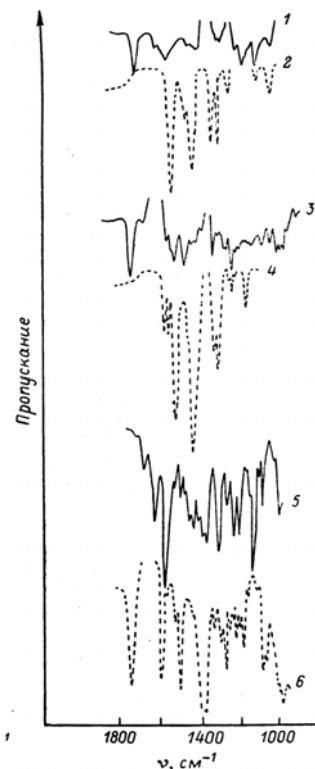


Рис. 28. ИК флуоресцеина, 0.012 М (1,2), эритрозина, 0.03 М (3,4) и родамина Б, 0.03 М (5,6) в 99.7 %-ном ДМСО: 1 – форма H_2R ; 2 – форма R^{2-} , конц. $\text{NaOH} \geq 0.03\text{ М}$; 3 – форма H_2R , 0.1 М HCl ; 4 – форма R^{2-} , конц. $\text{NaOH} > 0.06\text{ М}$; 5 – форма HR^+ (катион); 6 – форма R , конц. $\text{NaOH} > 0.03\text{ М}$ [287].

В случае бенгальского розового Б и 2,7-дихлорфлуоресцеина значения $\text{p}K_{a1}$ и $\text{p}K_{a2}$ в ДМСО, вероятно, слишком близки для того, чтобы можно было наблюдать спектр моноаниона HR^- . Такое объяснение согласуется с данными табл. 15. То же относится к флуоресцеину и его 3',4',5',6'-тетрахлорпроизводному,

Таким образом, ИК спектры в растворах подтверждают как последовательность превращения 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных, установленную при помощи электронной спектроскопии, так и строение дианиона (VII).

В то же время, уже отмеченное выше отсутствие дианионов-лактонов фенолфалеина в ДМСО подтверждается ИК спектрами: полоса, которую можно было бы отнести к $\nu(\text{C}=\text{O})$

лактона, отсутствует в условиях достаточного количества щелочи. В то же время, в метаноле, где, по данным электронной спектроскопии, лактонный таутомер является преобладающим для дианиона R^{2-} , нейтрализация фенолфталеина метилатом натрия привела лишь к смещению полосы от 1747 см^{-1} к 1730 см^{-1} [302].

Завершая этот раздел, отметим, что данные спектров ПМР и ЯМР ^{13}C нейтральных форм в дейтерированном метаноле и ДМСО однозначно указывают на sp^3 -гибридизацию центрального атома углерода: химический сдвиг составляет 83.5 и 81.0 м.д. против ≈ 160 м.д. в ионах, что связывается с преобладающим лактонным строением [146,363,364]. Этот вывод подтверждается данными другой работы, в которой для лактона диацетилфлуоресцеина и его аналогов химический сдвиг центрального атома углерода оказался равным 82.0 м.д. [358]. Характер сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C в растворах и изменений их при добавлении щелочи позволил нам в работе с Л. А. Федоровым и другими [294] подтвердить существование нейтральной формы R родамина Б главным образом в виде лактона в ДМСО и в виде цвиттериона – в метаноле, в соответствии с данными электронной спектроскопии.

7. Возбужденное состояние и кислотно-основные равновесия

Среди нескольких десятков флуоресцентных кислотно-основных индикаторов, известных к 1940 году, уже упоминались флуоресцеин и его галогенпроизводные [378]. В том же году Х. Гото опубликовал достаточно обстоятельное исследование зависимости интенсивности флуоресценции водных растворов флуоресцеина и эозина от pH (по 15 растворов, pH от 2.71-2.79 до 12.84) [379]. Первые работы, посвященные применению флуоресцеина в качестве флуоресцентного индикатора pH, появились даже раньше, в 30-е годы XX столетия [5]. Еще в начале 50-х годов Н. А. Измайлов и С. М. Петров обстоятельно исследовали свойства флуоресцеина и его галогенпроизводных в неводных средах [74,317,380]. Например, были определены интервалы pH перехода флуоресценции в 50%-ном ацетоновом растворе с использованием специально разработанной для этого растворителя универсальной буферной смеси [380].

Имеются данные о люминесценции флуоресцеина при различных значениях pH в водных растворах [11-15,28,30,34,124,126,157,166,168,169,381-383], в сахарных леденцах, борных перлах, в спиртовых и глицериновых растворах [11,12,127,381], в разнообразных водно-органических смесях [170], в стеклах, полученных при различных исходных значениях pH [384], в пленках этилцеллюлозы [385].

Исследовалось влияние pH на флуоресценцию производных флуоресцеина в различных системах, в частности димеркуроацетата флуоресцеина в стеклах [384], флуоресцеина, включенного в повторяющееся звено полимера [315], в липидные монослои [159,181,182] или прикрепленного к биомолекулам либо имитирующим их соединениям [89-91,96,97].

Большое значение для понимания процессов испускания света различными ионными формами флуоресцеина имеет исследование модельных соединений, в частности, 6-гидроксиг-фенилфлуорона и его аналогов [15,16,139,203,386,387].

В работе К. Хираки и Я. Нишикавы [21] исследован целый ряд флуоресцентных индикаторов pH. Константы диссоциации оценивались из изменения флуоресценции при варьировании кислотности. Значения максимума полосы испускания и pK для флуоресцеина найдены равными 518 нм и 4.6, для дихлорфлуоресцеина: 528 нм и 3.9, для эозина: 545 нм и 2.8, и для эритрозина: 552 нм и 3.6. Интервал pH перехода флуоресценции у этих индикаторов составил 1.8, 2.2, 2.6 и 2.1, соответственно. Для флуоресцентного кислотно-основного титрования в этой работе рекомендован смешанный индикатор: флуоресцеин + метилумбеллиферон. Впоследствии это же сочетание красителей исследовалось другими авторами как смесь для лазерной техники [388].

Х. Диль [157] оценил вклады разных форм флуоресцеина во флуоресценцию его водных растворов при 516 нм (возбуждение при 489 нм) на основании данных о константах равновесия при $I = 0.1$ М. Если принять вклад дианиона R^{2-} за 100 единиц, то вклад H_2R составляет 0.8, а HR^- : 5.7.

М. Чои и П. Хавкинс исследовали влияние диоксида углерода на флуоресценцию и возбуждение флуоресценции флуоресцеина в системе *N,N*-диметил-*n*-толуидин – ДМФА [176,177].

Флуоресцеин является основным метчиком люминесцирующих антител, применяется как зонд на проницаемость мембран, а зависимость его флуоресценции от pH используется для измерения внутриклеточных значений pH [6,9]. При этом возникает проблема полноты связывания красителя, так как важно, чтобы сигнал поступал именно из внутриклеточного пространства. Часто используется флуоресцеин, присоединенный к декстрану или белкам – обычно ковалентной привязкой через ФИТЦ.

Во всех перечисленных случаях принципиально важным является вопрос о кислотно-основных свойствах флуоресцеина и его производных в возбужденном состоянии [3,13,14,17,28,30,34,148,166,168].

То, что кислотно-основные свойства веществ в основном и возбужденном состояниях вообще говоря не совпадают и могут различаться очень сильно, хорошо известно [3,306,389,390]. В некоторых случаях достаточно правдоподобной является оценка значения показателя константы кислотной диссоциации в нижнем синглетном состоянии, pK_a^* , при помощи так называемого цикла Фёрстера:

$$pK_a^* = pK_a + \frac{h}{2.303RT}(\nu_A - \nu_{HA}), \quad (30)$$

где h – постоянная Планка, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, ν_A и ν_{HA} – частоты в электронных спектрах поглощения соответственно аниона и сопряженной кислоты, отвечающие максимумам длинноволновых полос [3,306,390].

Но с точки зрения интерпретации экспериментальных данных вопрос заключается в следующем: чему соответствует значение pK_a^* , получаемое при использовании зависимости интенсивности флуоресценции (или квантового выхода флуоресценции) от pH (аналогично тому, как это делается для зависимости оптической плотности от pH)? Например, как квалифицировать опубликованные недавно значения pK_a фторпроизводных флуоресцеина в водном растворе, определенные из зависимости интенсивности флуоресценции от pH [201]?

Ответ на поставленный вопрос в значительной мере определяется соотношением двух времен: времени установления равновесия в возбужденном состоянии и времени жизни флуоресценции. Возможны, вообще говоря, три случая. (1) Если протолитическое равновесие в возбужденном состоянии устанавливается гораздо медленнее, чем происходит испускание, то абсцисса точки перегиба зависимости интенсивности флуоресценции от pH будет соответствовать pK_a . (2) Если равновесие в возбужденном состоянии устанавливается очень быстро, и испускание света происходит уже из равновесного возбужденного состояния, то указанная зависимость дает значение pK_a^* . (3) Если два указанных времени соизмеримы, то точка перегиба не соответствует в общем случае ни pK_a , ни pK_a^* . Кроме того, в каждом конкретном случае необходимо учитывать особенности спектрально-люминесцентных свойств участников кислотно-основной реакции, поскольку от них зависит степень перехода в возбужденное состояние при выбранной длине волны возбуждения.

М. Мартин и Л. Линдквист [15] исследовали зависимость квантового выхода флуоресценции флуоресцеина и 6-гидрокси-9-фенилфлуорона от pH в водных растворах и оценили значения квантовых выходов различных форм. Нейтральная форма флуоресцеина, согласно этим авторам, в возбужденном состоянии представлена хиноидным таутомером III (в наших обозначениях, см. схему 1). Таким образом, предполагается размыкание лактонного цикла в возбужденном состоянии. В согласии с другими исследователями [17] эти авторы полагают, что испускание происходит до достижения равновесия в возбужденном состоянии; предполагается, что значение pK_{a2}^* , оцененное из цикла Фёрстера, должно быть примерно на единицу ниже, чем pK_{a2} [15].

Через 20 лет на это же обстоятельство обратили внимание шведские исследователи [168], правда, без ссылок на вышеупомянутые работы [15,17]; по их оценкам, тоже сделанным на основании цикла Фёрстера, в водном растворе значение pK_{a2}^* флуоресцеина должно быть примерно на 0.5 ед. ниже, чем pK_{a2} [168], а оценка pK_{a2}^* из спектров флуоресценции [34] ошибочна. В этой же работе оценены вклады различных форм во флуоресценцию [168].

В работах другой исследовательской группы предполагается, что в одномолярном фосфатном буферном растворе в воде концентрация акцептора протона достаточно высока для быстрого достижения состояния равновесия в возбужденном состоянии [28,166]. В свою очередь, это не подтверждается Н. Клонисом и В. Сэвайером [169], исследовавшими возбужденное состояние флуоресцеина и определившими квантовый выход φ и времена жизни флуоресценции τ форм R^{2-} , HR^- , H_2R и H_3R^+ .

По данным этих и других авторов [15,26,168,169], значения φ форм R^{2-} , HR^- , H_2R и H_3R^+ составляют соответственно 0.93, 0.25-0.37, 0.20-0.29 и 0.9-1.0, а τ форм R^{2-} , HR^- и H_2R – соответственно 4.06-4.16, 3.0-3.37 и 2.97 нс.

Н. Клонис и В. Сэвайер изучили также влияние растворителя на спектры поглощения и флуоресценции моноаниона флуоресцеина HR^- [170]; недавно спектры поглощения и флуоресценции моноаниона HR^- в воде были получены обработкой трехмерных (возбуждение, испускание, pH) массивов данных [30].

Из зависимости интенсивности флуоресценции от pH К. Драммонд и соавторы [159] получили значения pK_a 4'-иодацетамидофлуоресцеина в безбуферных водных растворах: $pK_{a1} = (3.77-4.0)$ и $pK_{a2} = (6.60-6.66)$. При переходе к мицеллярным растворам неионного ПАВ оба значения pK_a увеличиваются при одновременном их сближении.

Значительный интерес представляет также исследование фосфоресцирующего триплетного состояния флуоресцеина [3,18,391].

В большой серии работ Д. Никерса с сотрудниками [10,49-53,392] и других авторов [393,394] гидроксиксантены были исследованы как сенситизаторы фотоокисления. В этом отношении наиболее перспективными оказались бенгальский розовый Б и его производные. Проводятся новые исследования фотолиза бенгальского розового Б, имеющие значение понимания механизма действия этого красителя в качестве фотоинициатора полимеризации [395].

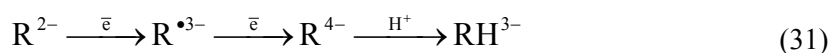
Фотовосстановление воды, сенситизированное бенгальским розовым Б, изучено А. В. Ельцовым с сотрудниками [46]. Как показано в работах этой группы исследователей, октабромфлуоресцеин и производные тиофлуоресцеина являются эффективными катализаторами генерирования водорода из водных растворов [46,59,195,199]. Перенос энергии в ионных ассоциатах анионов гидроксиксантенов с катионами РЗЭ давно является предметом детального исследования [36-39,333].

8. Электровосстановление флуоресцеиновых красителей

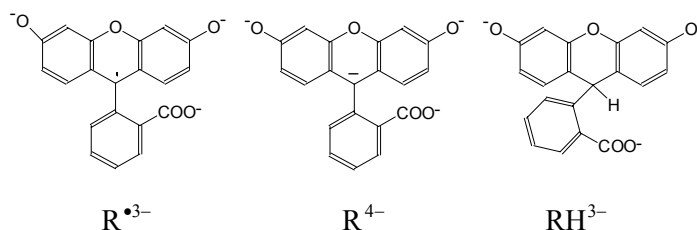
Наряду с протолитическими превращениями и поглощением-испусканием электромагнитных колебаний флуоресцеиновые красители могут участвовать в редокс-процессах.

Ряд работ посвящен образованию свободных радикалов ксантеновых красителей вследствие фотохимических процессов [13,396-398]. Имеется недавняя работа по спектрам ЭПР ряда трифенилметановых красителей и эозина [399].

Электровосстановлению гидроксиксантеновых и родственных им красителей посвящен целый ряд исследований [23,369,400-404]. На последней стадии электровосстановления на ртутном каплюющем электроде двухзарядных анионов гидроксиксантеновых красителей происходит превращение карбаниона R^{4-} в трехзарядный анион RH^{3-} , являющийся СН-кислотой:



Структуры анион-радикала, карбаниона и продукта его протонирования представлены ниже на примере флуоресцеина:



Поскольку использование органических растворителей в полярографии помогает предотвратить адсорбционные эффекты [405] и получить более четкую картину, нами было исследовано электровосстановление флуоресцеина, сульфифлуоресцеина и эозина (а вместе с ними – и *N,N*-диэтилродола, родамина Б и сульфифталеиновых красителей) в неводных средах [296]. В качестве растворителей были выбраны ДМФА и водно-этанольная смесь с массовой долей спирта 91 %. В ДМФА источником протонов для последней («химической») стадии превращений (31) является вода, небольшие количества которой содержатся в растворителе (см. примечания к табл. 16).

Действительно, адсорбционных волн мы не наблюдали даже для эозина. Для оценки кислотности среды использовали шкалу pa_H^* . При интерпретации результатов с помощью значений pK_a деполаризаторов следует учитывать их возможные отличия от «полярографических» констант диссоциации [405]; влияние двойного электрического слоя сводится к повышению концентрации протонов в приэлектродном пространстве. Количество электронов n , участвующих в процессе восстановления в буферных средах, определяли при помощи уравнения (32) [406].

$$E_{1/2} = E_0 - \frac{2.3 mRT}{cnF} pa_H^* \quad (32)$$

Для обратимых процессов $\alpha = 1$, и из значения величины коэффициента $\partial E_{1/2} / \partial pa_H^*$ может быть найдено число протонов m (если $m = n$, то при 20 °C $\partial E_{1/2} / \partial pa_H^* = -58$ мВ/ед. pa_H^*); в случае необратимых процессов значение коэффициента $\partial E_{1/2} / \partial pa_H^*$ уже не совсем точно соответствует количеству протонов, участвующих в реакции. В ДМФА полярограммы снимались главным образом на фоне перхлората тетраэтиламмония в области pa_H^* 7.6-14.2, при ионной силе 0.0024 М, а также в растворах $N(C_2H_5)_4OH$ (0.0024 М), а в 91 %-ном этаноле – в области pa_H^* 4.3-9.5, при ионной силе 0.0075 М, и в растворах LiOH (0.0075 М). В обоих растворителях сильноокислые среды создавали при помощи H_2SO_4 (до 0.75 М).

Оказалось, что полная редокс-схема здесь гораздо сложнее, чем схемы для углеводов, хинона или халконов [406]; так, для флуоресцеина следует учитывать до 25 различных структур, в том числе до 18 продуктов восстановления, хотя вероятность их существования совершенно различна. В ряде случаев снижение предельного тока было объяснено существованием трудно восстанавливаемых лактонов.

В 91%-ном водном этаноле и в ДМФА красители существуют в виде ионов R^{2-} в области высоких значений pa_H^* . Дианионы дают в этой области две одноэлектронные диффузионные волны: первая волна – обратимая, вторая – необратимая. Анализ значений потенциалов полуволн, $E_{1/2}$, показал, что значения $-E_{1/2}$ убывают при переходе от воды к 91%-ному спирту или к ДМФА практически для всех исследованных соединений. Очевидно, главной причиной этого является лучшая сольватация анионов в воде, чем в органических растворителях. При этом считаем, что изменения $E_{1/2}$ за счет скачка жидкостного потенциала при измерениях против насыщенного каломельного электрода незначительны и не вносят основного вклада в наблюдаемые эффекты.

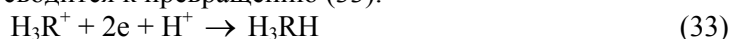
Для исследованных красителей при переходе от воды к 91% C_2H_5OH и затем к ДМФА заметно увеличивается «раздвижение» первой и второй волн. Значения $\Delta E_{1/2} = E_{1/2}(I) - E_{1/2}(II)$ в ДМФА по сравнению с водой увеличиваются в среднем на 0.3 В, а по сравнению с водным этанолом – на 0.15 В. Например, для флуоресцеина (R^{2-}) в сильнощелочной среде в 91%-ном этаноле и в ДМФА значения $-E_{1/2}$ (I) составляют соответственно 0.75 В и 0.86 В, а $-E_{1/2}$ (II): 1.28 В и 1.48 В, соответственно (± 0.01 В). Значения $\Delta E_{1/2}$ в воде, 91%-ном водном этаноле и в ДМФА составляет соответственно 0.25, 0.53 и 0.62 В. Столь явно выраженное дифференцирующее действие растворителя по отношению к стадиям одноэлектронного восстановления, закономерно усиливающееся при переходе от водного этанола к апротонному ДМФА, может на первый взгляд показаться странным: ведь даже для первой, обратимой волны отмечен ряд аномалий в изменениях $E_{1/2}$. Тем более что речь идет не об апротонной в привычном смысле слова среде; в воде восстановление протекает в данном случае также без участия протонов до при-

соединения второго электрона (ур. 31), то есть реализуется механизм, который принято обозначать как ЕЕС (две электрохимические стадии и затем одна химическая).

Мы предлагаем следующее объяснение. Факторы, оказывающие влияние на значения $E_{1/2}$ (такие, как сольватация заместителей, характер диффузии красителей, стерические эффекты, а в воде – и адсорбция на ртутных каплях), носят примерно одинаковый характер как для самих деполяризаторов в окисленной форме (то есть для исходных анионов), так и для ион-радикалов. Решающим же фактором является повышенная стабильность анион-радикалов с сильно делокализованным зарядом, таких, как $R^{\bullet 3-}$, в органической среде и особенно – в ДМФА, благодаря дисперсионным взаимодействиям с молекулами растворителя. Если концентрирование катионов $N(C_2H_5)_4^+$ в приэлектродном вызывает ионную ассоциацию, то резонно допустить, что последняя протекает примерно одинаково для анионов различных красителей.

Причиной ra_H^* -независимости второй (необратимой) волны является то, что протонирование происходит уже после присоединения к анион-радикалу второго электрона. В среде ДМФА, с учетом начальных концентраций деполяризатора (0.001 М), а также воды, метанола и $N(C_2H_5)_4OH$ (0.013, 0.04 и 0.0024 М, соответственно), положение равновесия $R^{4+} + H_2O \rightleftharpoons RH^{3+} + OH^-$ можно считать в значительной мере смещенным вправо, на основании расчетов, проведенных для равновесий ($Ar_3C^+ + H_2O \rightleftharpoons Ar_3CH + OH^-$) в сходном растворителе (ДМСО) с использованием значений pK_a незаряженных СН-кислот трифенилметана, метанола, ксантена и фенилксантена (30.6, 29.0, 30.0 и 27.9, соответственно) [407]. В водном этаноле существование R^{4+} тем более невозможно.

Однако механизм ЕЕС реализуется лишь при высоких значениях $ra_{H^+}^*$. В кислой области ra_H^* для ксантовых (как и для сульфоталеиновых) соединений мы зарегистрировали двух-электронные необратимые и ra_H^* -независимые волны, не наблюдающиеся в других случаях; Например, для флуоресцеина процесс сводится к превращению (33).



Помещая символ Н после символа R, мы подчеркиваем тем самым, что этот атом водорода присоединен к центральному атому углерода (C_9). Таким образом, в неводных растворителях подтверждается закономерность, отмеченная в литературе для водных растворов. Такая природа волн не противоречит протеканию электровосстановления по механизму диспропорционирования [404]; процессы же димеризации с образованием связи C – C менее вероятны. Восстановление катионов в целом способствует росту предельных токов, но в связи с необратимостью двухэлектронных ra_H^* -независимых волн значения $E_{1/2}$ трудно увязать со строением деполяризаторов.

Для катионов флуоресцеина, *N,N*-диэтилродола и родамина Б значения потенциалов полуволн в ДМФА (–0.64, –0.38 и –0.56 В) и в 91%-ном этаноле (–0.64, –0.45 и –0.52 В) сходны. В воде у катионов флуоресцеина и родамина Б $E_{1/2}$ –0.50 В и –0.48 В, соответственно.

Для сульфифлуоресцеина в кислой среде в ДМФА необратимая ($n = 2$) волна с $E_{1/2}$ –0.44 В отвечает, вероятно, процессу: $H_2R + 2e + H^+ \rightarrow H_2RH^+$, хотя исключить протонирование группы SO_3^- при $ra_H^* < 3$ нельзя. Важно отметить, что при переходе от сернокислотных растворов к средам с более высокими ra_H^* в случае флуоресцеина и родамина Б наблюдается снижение предельного тока, вызванное, очевидно, появлением в растворе трудно восстанавливаемых лактонов.

Далее волны становятся ra_H^* -зависимыми и остаются таковыми вплоть до довольно высоких значений ra_H^* ; нецелочисленность n ($2 > n > 1$) указывает на вероятность диспропорционирования с внутрирадикальным и межрадикальным переносом протона. Флуоресцеин, эозин, сульфифлуоресцеин, а также сульфоталеины ведут себя здесь сходным образом.

Таким образом, в сильнощелочной среде подтверждается механизм ЕЕС [ур. (31)], в то время как при более низких значениях ra_H^* реализуются механизмы, обозначаемые, согласно Р. Комптону [404], как DISP1 и (в еще более кислой среде) DISP2. Например, после электро-

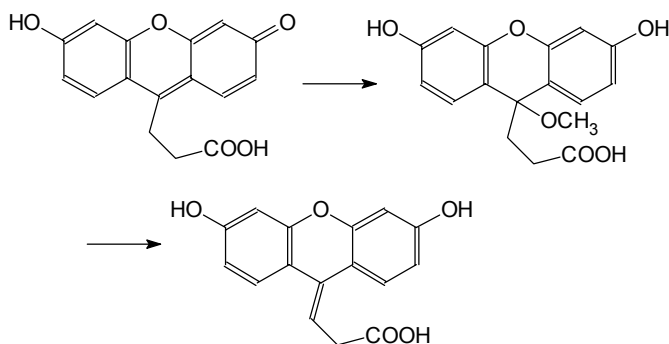
восстановления дианиона флуоресцеина R^{2-} до ион-радикала может происходить протонирование последнего ($R^{\bullet 3-} + H^+ \rightarrow HR^{\bullet 2-}$). Далее происходит диспропорционирование по ур. (34), фактически становящееся необратимым из-за крайне слабой диссоциации СН-кислоты.



Для родамина Б в водном растворе при pH 9.18 мы также наблюдали двухэлектронную волну с $E_{1/2} -0.885$ В, причем значение предельного тока по сравнению с волной при pH 1.68 не изменилось; смещение значения $E_{1/2}$ в катодную область на 0.40 В отражает влияние отрицательного заряда карбоксилата в цвиттерионной структуре по сравнению с катионом.

9. Свойства малоизученных аналогов и производных флуоресцеина

Может создаться впечатление, что не только спектрально-люминесцентные, но и протолитические свойства флуоресцеиновых красителей исследованы очень подробно. Но в сущности это относится лишь к галогенпроизводным флуоресцеина, причем систематические исследования фторпроизводных стали возможны лишь недавно [201]. Достаточно скудная информация имеется о равновесиях сукцинилфлуоресцеина, содержащего вместо фталевого кольца остаток янтарной кислоты. Для этого соединения в 50 %-ном водном метаноле сообщаются значения $pK_{a0} = 2.90$, $pK_{a1} = 4.60$ и $pK_{a2} = 6.80$ [160]. При этом указывается, что в водном метаноле лактонного таутомера нейтральной формы не обнаружено, а протолитические равновесия сводятся к последовательному превращению катиона в молекулу, имеющую хиноидное строение, затем в хиноидный анион и далее в дианион R^{2-} [160]. В чистом метаноле предполагаются следующие превращения:



Хиноидный таутомер окрашен, а две последние структуры бесцветны [160]. Выделив катион сукцинилфлуоресцеина в виде препарата солянокислой соли, эти авторы сообщают, что плавящийся при 225-230 °С фиолетовый хлорид теряет HCl и превращается в коричневый цвиттерион с температурой плавления выше 300 °С; в этот же таутомер превращается при нагревании желтый хиноид, плавящийся при 155-160 °С [365]. При этом указывается, что идентификация таутомеров в твердом состоянии проводилась при помощи ИК спектров главным образом путем сопоставления с работой Р. Маркушевского и Х. Диля [350]. Но в последней работе желтый цвет приписывается как раз цвиттериону, и при нагревании он превращается в красный хиноид, а не наоборот [350].

При помощи спектров ЯМР обнаружено, что в ДМСО нейтральная форма сукцинилфлуоресцеина существует в виде смеси лактонного и хиноидного таутомера в соотношении 5 : 1 [365].

Фотофизические свойства и электровосстановление нафтофлуоресцеиновых красителей изучались А. В. Ельцовым с сотрудниками [199,403]. Ниже рассмотрим две группы малоизученных аналогов и производных флуоресцеина, исследованные нами в последнее время.

Диссоциация тиааналогов и нитропроизводных флуоресцеина. До недавнего времени были еще две группы красителей обсуждаемого типа, исследованных явно недостаточно. Это, во-первых, тиааналоги флуоресцеинов, содержащие вместо гетероциклического кислорода атом серы, а, во-вторых, нитропроизводные флуоресцеина.

Начиная с 1999 года нами совместно с Д. В. Самойловым и Н. А. Водолазкой были исследованы обе эти группы красителей; при этом были использованы препараты высокой чистоты, синтезированные в лаборатории профессора А. В. Ельцова (Санкт-Петербургский государственный технологический институт). Выше уже приводились данные для тиюфлуоресцеина в воде (таблицы 1 и 2); результаты определения параметров ионных равновесий для прочих соединений в 50 %-ном (по массе) водном этаноле даны в таблице 19. Такой выбор состава растворителя был обусловлен прежде всего недостаточной растворимостью некоторых из красителей в воде.

Прежде всего, было обнаружено, что значения констант диссоциации и таутомеризации тиюаналогов флуоресцеина, эозина и эритрозина, исследованных нами в воде и в водно-органических смесях [258,314], очень близки к значениям параметров соответствующих гидроксиксантонов (табл. 1, 19). Но при этом значения E_{\max} полос поглощения всех ионных форм тиюаналогов оказались существенно более низкими (табл. 2, 19); этот факт, предварительно обсужденный в одной из наших работ [314], еще ждет своего окончательного объяснения.

Совершенно новый эффект был нами обнаружен в результате исследований нитропроизводных флуоресцеина: было показано, что в случае гидроксиксантонов, содержащих группу NO_2 в положениях 2 и 7, возможно существование анионов-лактонов [312,313], ранее наблюдавшихся лишь для фенолфталейна и его производных (см. выше). Картина протолитических равновесий усложняется (схема 2).

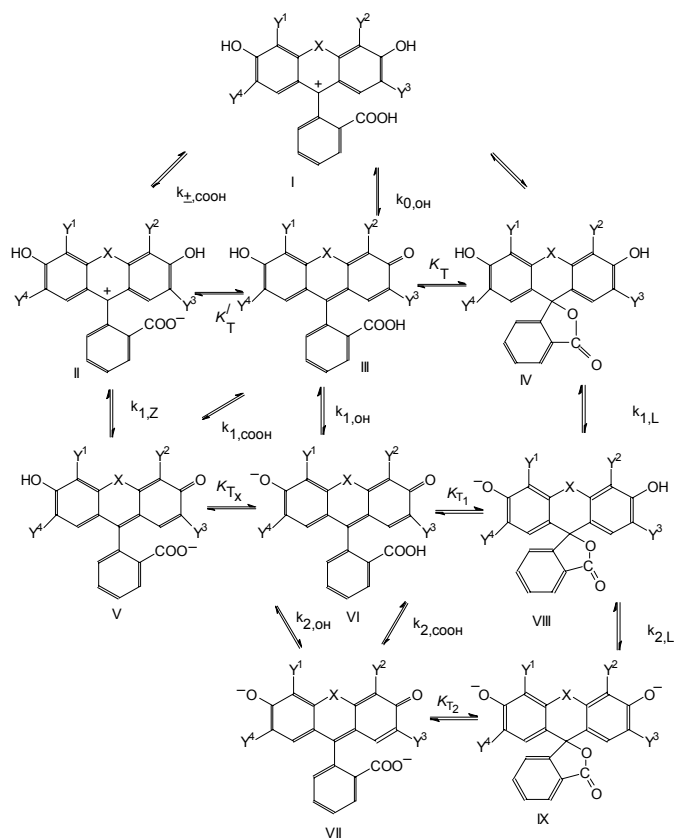


Схема 2. Протолитические равновесия тиюаналогов и нитропроизводных гидроксиксантоновых красителей.

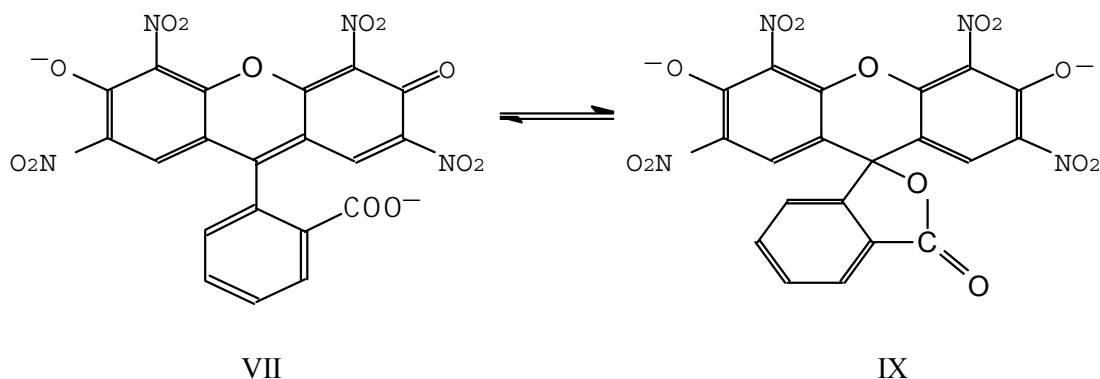
$$\begin{aligned}
 K_T &= [\text{IV}]/[\text{III}]; K'_T = [\text{II}]/[\text{III}]; K''_T = K_T / K'_T = [\text{IV}]/[\text{II}]; K_{Tx} = [\text{VI}]/[\text{V}]; \\
 K_{T1} &= [\text{VIII}]/[\text{VI}]; K'_{T1} = [\text{VIII}]/[\text{V}]; K_{T2} = [\text{IX}]/[\text{VII}]; k_{\pm, \text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{II}} / a_{\text{I}}; \\
 k_{0, \text{OH}} &= a_{\text{H}^+}^* a_{\text{III}} / a_{\text{I}}; k_{1, Z} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{V}} / a_{\text{II}}; k_{1, \text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{V}} / a_{\text{III}}; k_{1, \text{OH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VI}} / a_{\text{III}}; k_{1, L} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VIII}} / a_{\text{IV}}; \\
 k_{2, \text{OH}} &= a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VII}} / a_{\text{V}}; k_{2, \text{COOH}} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{VII}} / a_{\text{VI}}; k_{2, L} = a_{\text{H}^+}^* a_{\text{IX}} / a_{\text{VIII}}.
 \end{aligned}$$

Таблица 19. Параметры равновесий красителей в 50%-ном (по массе) водном этаноле (25 °C) [312-314]

№		pK_{a0}	pK_{a1}	pK_{a2}	λ_{\max} , нм ($E_{\max} \cdot 10^{-3}$, л моль ⁻¹ см ⁻¹)			
					H_3R^+	H_2R	HR^-	R^{2-}
1	Флуоресцеин	0.94	6.82	7.66	445 (62.4)	455 (0.978)	455 (34.3)	495 (88.5)
2	2,4,5,7-Тетрабромфлуоресцеин (Эозин)	—	3.46	5.98	—	480 (5.19)	530 (84.0)	520 (99.6)
3	2,4,5,7-Тетраиодфлуоресцеин (Эритрозин) ^a	—	3.2	6.0	465 (42.6)	484 (15.7)	537 (91.3)	529 (102.6)
4	Тиофлуоресцеин	0.92±0.01	6.85±0.12	7.88±0.06	445 (11.5)	490 (0.2)	490, 515 (5.0)	517.5 (22)
5	2,4,5,7-Тетрабромтиофлуоресцеин	—	2.56±0.02	6.20±0.05	—	505 (4.3)	545 (48.0)	536 (46.6)
6	2,4,5,7-Тетраиодтиофлуоресцеин	—	2.12±0.03	6.37±0.08	—	510 ^b	555 ^b	544 ^b
7	4,5-Дибромфлуоресцеин	—	5.85±0.06	6.24±0.04	—	470 (1.7)	515 (32.5)	510 (72.5)
8	4,5-Динитрофлуоресцеин	—	5.36±0.16	5.0±0.2	—	—	503 (93)	493 (76)
9	4-Нитротифлуоресцеин	—	5.80±0.07	6.81±0.04	—	475 (1.6)	475 (15.0)	520 (39.4)
10	4,5-Динитротифлуоресцеин	—	4.99±0.14	5.69±0.05	—	—	520 (40.0)	512 (48.0)
11	4,5-Динитро-N-этилазафлуоресцеин	—	3.54±0.02	5.87±0.06	—	470 (14.3)	480 (42.7)	475.5 (42.3)
12	4,5-Динитро-2,7-дибромфлуоресцеин	—	1.12±0.02	5.33±0.04	—	480 (18.0)	514 (81)	505 (80)
13	4,5-Дибром-2,7-динитрофлуоресцеин	—	3.39±0.04	5.15±0.08	—	—	≈ 400 (4.0), 543 (22)	410 (8.3), 536 (14.4)
14	4,5-Дибром-2-нитрофлуоресцеин	—	4.31±0.04	6.19±0.03	—	—	410 (5.1), 525 (21.5)	410 (5.1), 519 (61)
15	2,4,5,7-Тетранитрофлуоресцеин	—	1.4±0.2	2.38±0.11	—	—	400 (6.2), 516 (34)	407 (15.1), 515 (≈ 1)

^a В 40%-ном этаноле. ^b Значения E_{\max} не приводятся, так как в нашем распоряжении было недостаточное количество очищенного красителя для взятия большой навески.

Особенно выражен данный эффект для дианиона 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина, для которого в большинстве растворителей таутомерное равновесие



практически полностью сдвинуто вправо; при этом благодаря «нитрофенолятному» поглощению ксантового фрагмента анионы-лактоны могут быть не бесцветными (чего можно было бы ожидать вследствие sp^3 -гибридизации центрального атома углерода), а желтыми (λ_{\max} в области 400-440 нм).

Спектры анионов HR^- и R^{2-} различных нитропроизводных флуоресцеина, а также всех форм 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеина представлены на рис. 29.

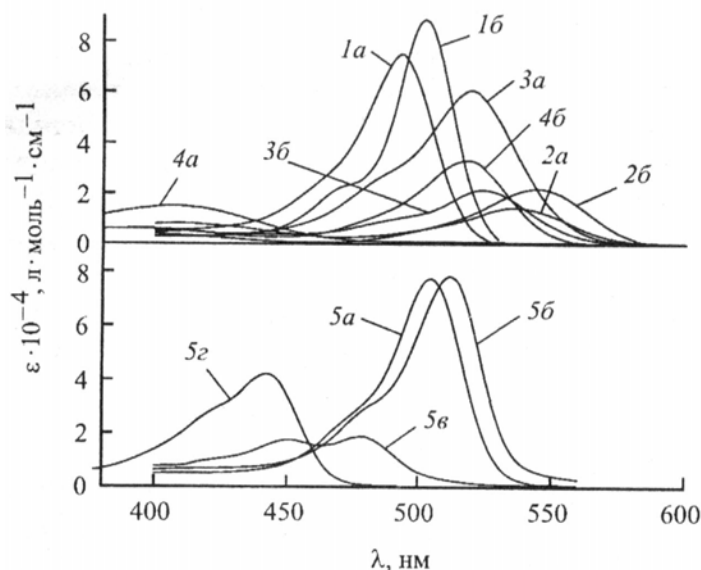


Рис. 29. Спектры поглощения дианионов R^{2-} при $pa_{H^+}^* = 6.9$ (1а-5а) и расчетные спектры моноанионов HR^- (1б-5б) 4,5-динитрофлуоресцеина (1а,б); 4,5-дибром-2,7-динитрофлуоресцеина (2а,б); 4,5-дибром-2-нитрофлуоресцеина (3а,б); 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина (4а,б); 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеина (5а,б); 5в – спектр нейтральной формы H_2R 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеина; 5г – спектр катиона H_3R^+ 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеина. Спектры 5в и 5г измерены в 5 М и 18 М водной серной кислоте, остальные спектры получены в 50 %-ном (по массе) водном этаноле [312,313].

При этом выяснилась очень важная, но пока до конца не объясненная закономерность: склонность к образованию анионов-лактонов проявляют только те нитропроизводные, у которых группы NO_2 находятся в положениях 2 и 7, но не в положениях 4 и 5. Так, у 4,5-динитрофлуоресцеина и 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеина характер полос анионов HR^- и R^{2-} очень напоминает таковой для эозина, эритрозина и других 2,4,5,7-тетрагалогенфлуоресцеинов.

Уже упоминавшиеся выше расчеты Д. Чунга с сотрудниками подтверждают, что в случае незамещенного флуоресцеина доля анионов-лактонов пренебрежимо мала как в растворах, так и в газовой фазе [218]. В то же время, расчет стандартных энтальпий образования дианионов в газовой фазе, проведенный Д. В. Самойловым, привел к выводу, что для гидроксиксантенов с нитрогруппами в положениях 2 и 7 вероятность образования дианионов-лактонов резко повышается, в согласии с экспериментальными данными для растворов [312,313]. Использование метода АМ1 показывает, что для дианионов R^{2-} 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина, 2,7-динитро-4,5-дибром- и 2-нитро-4,5-дибромфлуоресцеина лактонная структура дианиона заметно стабильнее хиноидной; различие достигает 46-75 кДж моль⁻¹ [312,313].

Нейтральные формы нитропроизводных проявляют сильную склонность к образованию бесцветных лактонов типа IV; 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеин представляет собой исключение, и хиноидный таутомер III отчетливо наблюдается в спектрах нейтральной формы как в водном этаноле (рис. 29), так и в ледяной уксусной кислоте (рис. 30). В то же время, сильные изменения значения E_{\max} (H_2R) при переходе от одного растворителя к другому отражают наличие подвижного равновесия ($III \rightleftharpoons IV$).

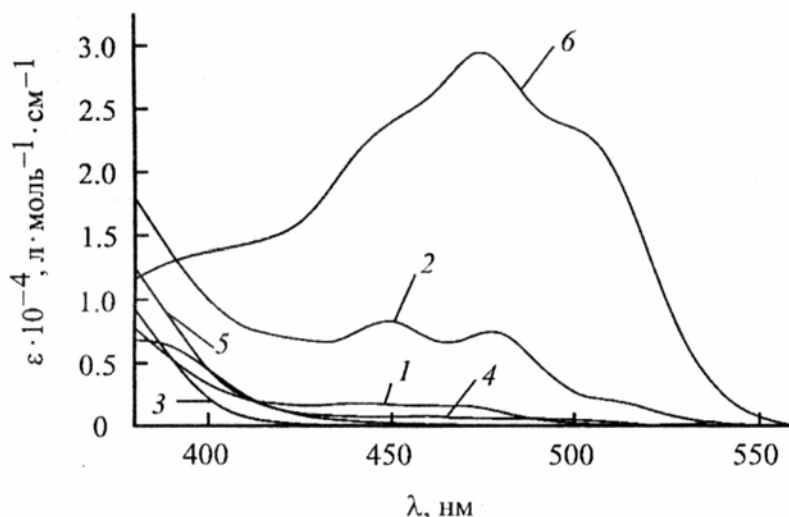


Рис. 30. Спектры поглощения нейтральных форм H_2R в уксусной кислоте: 1 – 4,5-динитрофлуоресцеин; 2 – 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеин; 3 – 4,5-дибром-2,7-динитрофлуоресцеин; 4 – 4,5-дибром-2-нитрофлуоресцеин; 5 – 2,4,5,6-тетранитрофлуоресцеин; 6 – эозин. В случае 4,5-динитро-2,7-дибромфлуоресцеина следы моноанионов HR^- устранялись добавками *n*-толуолсульфокислоты [312,313].

В том случае, если необходимо учитывать все возможные таутомеры, уравнения, «расшифровывающие» значения pK_a , приобретают следующий вид:

$$pK_{a0} = pk_{\pm, COOH} - \lg \left\{ 1 + K_T'' + (K_T')^{-1} \right\} \\ = pk_{0, OH} - \lg \left\{ 1 + K_T + K_T' \right\} = pk_{0, L} - \lg \left\{ 1 + K_T^{-1} + (K_T'')^{-1} \right\} \quad (35)$$

$$pK_{a1} = pk_{1, COOH} + \lg \left\{ 1 + K_T + K_T' \right\} - \lg \left\{ 1 + K_{T_x} + K_{T_1} \right\} \\ = pk_{1, Z} + \lg \left\{ 1 + K_T'' + (K_T')^{-1} \right\} - \lg \left\{ 1 + K_{T_x} + K_{T_1} \right\} \\ = pk_{1, OH} + \lg \left\{ 1 + K_T + K_T' \right\} - \lg \left\{ 1 + K_{T_x}^{-1} + K_{T_1}' \right\} \\ = pk_{1, L} + \lg \left\{ 1 + K_T^{-1} + (K_T'')^{-1} \right\} - \lg \left\{ 1 + K_{T_1}^{-1} + (K_{T_1}')^{-1} \right\} \quad (36) \\ pK_{a2} = pk_{2, OH} + \lg \left\{ 1 + K_{T_x} + K_{T_1} \right\} - \lg \left\{ 1 + K_{T_2} \right\}$$

$$\begin{aligned}
 &= pk_{2,\text{COOH}} + \lg\{1 + K_{T_x}^{-1} + K_{T_1}'\} - \lg\{1 + K_{T_2}\} \\
 &= pk_{2,L} + \lg\{1 + K_{T_1}^{-1} + (K_{T_1}')^{-1}\} - \lg\{1 + K_{T_2}^{-1}\}
 \end{aligned}
 \quad (37)$$

Конечно, вычисление всех этих параметров детального равновесия представляет собой гораздо более сложную задачу, чем та, что решалась в случае флуоресцеина и эозина. В упомянутых публикациях [312,313] дан также анализ значений микроконстант k , оцененных при помощи значений констант таутомерных равновесий.

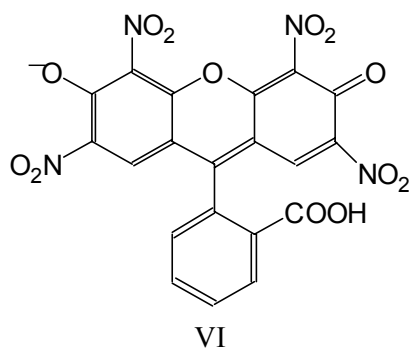
Недавно нами было проведено более подробное исследование свойств 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина в растворах, в том числе методом ИК спектроскопии [338]. Дополнительно к данным, представленным в табл. 19, при помощи спектрофотометрии в видимой области определены значения pK_a в ДМСО и в 90 %-ном (по массе) водном ацетоне, а также значения показателей «кажущихся» констант диссоциации pK_a^a этого красителя в мицеллярных растворах цетил-триметиламмоний хлорида на фоне 4.00 М KCl. Нейтральная форма красителя, H_2R , существует в растворах исключительно в виде бесцветного лактона IV.

Лактонная структура IX дианиона R^{2-} 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина преобладает уже в воде и в спиртах и полностью доминирует в большинстве растворителей самой различной природы: 90 %-ном водном ацетоне, в чистом ацетоне, ацетонитриле, ДМСО, хлороформе (хлороформные экстракты ионных ассоциатов R^{2-} с катионами тетра-*n*-бутил- и тетра-*n*-гептиламмония из водных растворов), а также в мицеллярных растворах ПАВ.

Желтый дианион-лактон IX в ДМСО характеризуется интенсивной полосой 1765 см^{-1} в ИК спектре в том же растворителе, отвечающей валентным колебаниям $C=O$ лактонного цикла.

Лактонное кольцо дианиона 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина не удается раскрыть введением в раствор катионов различных металлов; в отличие от лактонов родаминов [408], малахитового зеленого и кристаллвиолета [409-411], не происходит и фоторазмыкания этого цикла.

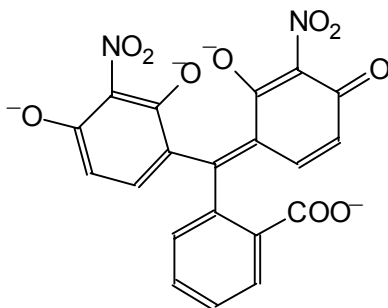
В противоположность дианиону, значительно более глубоко и интенсивно окрашенный моноанион 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина HR^- в различных растворителях характеризуется значениями $\lambda_{\text{max}} = 522\text{--}525\text{ нм}$ и $E_{\text{max}} \approx (60\text{--}62) \cdot 10^3\text{ л моль}^{-1}\text{ см}^{-1}$, что позволяет приписать ему ту же структуру, что и ионам HR^- эозина, эритрозина и других 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина (VI).



Этот ион флуоресцирует; стоксов сдвиг составляет около 1200 см^{-1} , а время жизни возбужденного состояния в 90 %-ном водном ацетоне найдено равным 2.3 нс (определение проведено А. В. Григоровичем в лаборатории профессора А. О. Дорошенко). Вероятно, небольшая доля ионов HR^- может существовать в виде лактона.

Интенсивная флуоресценция моноаниона тетранитрофлуоресцеина может найти применение в различных областях, в частности, при исследовании биологических объектов. Ограничением здесь является сравнительная узость интервала pH существования данной формы красителя. Определенные нами значения констант диссоциации 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина позволяют выбирать в различных растворителях узкие диапазоны кислотности, необходимые для обеспечения существенного выхода в растворе этого флуоресцирующего иона, фотофизические свойства которого еще практически не изучены.

При обработке 4,5-динитрофлуоресцеина холодной щелочью возникает вещество синего цвета (в воде при высоких значениях pH: $\lambda_{\max} = 580$ нм), что связано с размыканием пиранового цикла, аналогично флуоресцеину и эозину (см. выше). Вероятная структура тетрааниона представлена ниже:



При длительном стоянии щелочной раствор постепенно обесцвечивался, что обусловлено, вероятно, присоединением иона OH^- к центральному атому углерода. С другой стороны, при понижении значения pH водного раствора возникает обычная полоса дианиона 4,5-динитрофлуоресцеина ($\lambda_{\max} = 482$ нм).

Несмотря на проведенные исследования, физико-химические свойства нитропроизводных флуоресцеина безусловно изучены неизмеримо менее детально, чем галогенпроизводных; в то же время, их протолитические равновесия в растворах носят более сложный характер. В этой области весьма желательны новые систематические исследования, в частности, выяснение характера влияния растворителя на константы диссоциации и на таутомерию ионов и молекул.

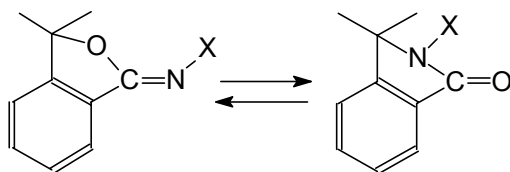
Другие ксантеновые красители. Мы не рассматриваем в настоящей статье обширный круг красителей, содержащих в положениях 2 и 7 ксантенового ядра две дополнительные гидроксигруппы. Эти реагенты – так называемые триоксифлуороны – давно и широко применяются в аналитической химии как высокочувствительные реагенты для фотометрического определения элементов III-VI групп Периодической системы [412]. Ксантены, содержащие гидроксигруппы в положениях 4 и 5, также очень распространены в аналитической практике; аналогами флуоресцеина и сульфифлуоресцеина являются красители галлеин и пирогаллоловый красный, соответственно. Наличие двух дополнительных кислотных групп делает протолитические равновесия этих соединений в растворах еще более сложными. Исследованию этих равновесий посвящен большой цикл работ В. А. Назаренко, В. П. Антоновича и их сотрудников [412-414].

Описаны также флуоресцентные свойства «сдвоенных» флуоресцеиновых красителей, в молекуле которых соединены два ксантеновых фрагмента [415].

Введение аминогруппы в остаток фталевой кислоты в положения 4' и 5' также значительно усложняет систему равновесий, и полный набор констант диссоциации для обоих изомеров аминфлуоресцеина пока не получен [416]. Необходимо иметь в виду, что примеси аминфлуоресцеина как исходного вещества могут содержаться в препаратах ФИТЦ, что необходимо учитывать при использовании последнего как метчика белков [417].

Тем более практически не исследованы еще закономерности влияния природы растворителя на все эти, более сложные, чем в случае флуоресцеина (схема 1), системы равновесий.

Наконец, в случае ксантеновых соединений, способных вместо лактонов образовывать лактамы [418-420], возможно существование двух различных бесцветных структур:



В то время как в одних работах [418,419] предполагается, что с центральным атомом углерода связан атом азота, имеется и противоположная точка зрения [420]. Поэтому для выяснения по-

ложения таутомерного равновесия в растворах, представленного выше, необходимы дальнейшие исследования, в частности, с привлечением метода ИК спектроскопии в ДМСО.

10. Флуоресцеиновые красители в экстракционных системах

Анионы флуоресцеиновых красителей обладают способностью образовывать с различными противоионами (например, с фенантролиновыми комплексами металлов или с краун-комплексами) ассоциаты, плохо растворимые в воде, но хорошо растворимые в ограниченно смешивающихся с водой растворителях. Такие ассоциаты называют тройными комплексами, разнолигандными комплексами типа ионных ассоциатов [421] либо относят к внешнесферным комплексам [422]. Они экстрагируются из водной фазы хлороформом и другими органическими растворителями; интенсивное светопоглощение и флуоресценция экстрактов могут быть использованы в аналитической практике для определения металло-ионов и других частиц, входящих в состав катиона [6,102-112].

Нами совместно с С. И. Егоровой и Э. Ариас Кордовой систематически исследованы равновесия распределения ксантеновых (а вместе с ними и сульфоталеиновых) красителей в системе вода/хлороформ, а также ионных ассоциатов их анионов с катионами тетрафениларсония и краун-комплексами металлов [243,423-426].

Значения параметров равновесий в двухфазной системе, в том числе констант распределения P нейтральных форм, представлены в табл. 20. Значения P рассчитаны из данных при различных значениях pH водной фазы, с учетом значений констант диссоциации в воде.

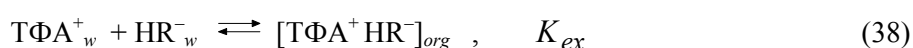
Таблица 20. Значения параметров равновесий ксантеновых красителей в системе $H_2O - CHCl_3$ (25 °C) [243,423-426]

Соединение	Интервал pH	$\lg P^a$	K_T	$\lambda_{\max}, \text{нм}$		$\lg K_{ex}^b$ (± 0.15)
				$TFA^+ HR^-$	$(TFA^+)_2 R^{2-}$	
Флуоресцеин	2.5 – 3.8	1.15 ± 0.02 (11)	2.7	463, 495	520	3.29
<i>N,N</i> -Диэтилродол	2.8 – 5.8	1.96 ± 0.07 (9)	1.81	515 ^b	—	4.62
Родамин Б	3.8 – 6.2	2.69 ± 0.03 (6)	2.0 ^r	—	—	—
Сульфифлуоресцеин	4.6 – 5.8	-1.27 ± 0.03 (4)	—	440, 495	523	3.93
2,7-Дихлорфлуоресцеин	1.2 – 6.2	2.08 ± 0.04 (9)	2.4	510	525	—
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	0.5 – 2.6	2.16 ± 0.01 (6)	2.3	475, 505	540	—
Эозин	0.5 – 3.1	3.69 ± 0.10 (16)	2.8	547	537	6.17
Этилэозин	3.4 – 6.7	5.5 ± 0.2 (15)	—	546 ^b	—	6.04
Эритрозин	2.0 – 2.6	3.31 ± 0.07 (6)	2.0	555	540	—
Бенгальский розовый А	1.1 – 3.0	2.27 ± 0.02 (12)	2.0	553	540	—
Бенгальский розовый Б	1.1 – 3.1	≈ 2.6 (16)	—	568	565	—

^a В скобках: количество опытов при различных значениях pH водной фазы, использованных для расчета константы распределения нейтральной формы. ^b Логарифмы констант экстракции ассоциатов однозарядных анионов красителей с катионами TFA^+ . ^r Ассоциаты $TFA^+ R^-$. ^r $K_T^{//}$.

Исследование таутомерии в двухфазной системе позволяет оценить константы распределения отдельных таутомеров, которые можно также называть микроконстантами распределения. Так, схема 3 отображает таутомерное равновесие флуоресцеина в двухфазной системе вода/хлороформ; растворители взаимно насыщенные.

Для однозарядных анионов красителей определены константы экстракции K_{ex} ионных ассоциатов:



Здесь, как и на схеме 3, нижние индексы w и org обозначают принадлежность к водной и органической фазам, соответственно. Значения K_{ex} также представлены в табл. 20. Анализ этих значений, а также сопоставление значений P и K_{ex} с литературными данными можно найти в

цитированных работах [243,423,424]. Константам экстракции ионных ассоциатов анионов HR^- и R^{2-} с комплексами ионов Li^+ , Na^+ , K^+ и Pb^{2+} с 18-краун-6 посвящена отдельная работа [426].

В порядке возрастания экстрагируемости ассоциатов дианионов R^{2-} с ионами $\text{As}(\text{C}_6\text{H}_5)_4^+$ гидроксиксантены могут быть расположены в следующий ряд:

флуоресцеин < сульфифлуоресцеин < 2,7-дихлорфлуоресцеин < < 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеин < эозин ≤ эритрозин < бенгальский розовый А < бенгальский розовый Б.

Таким образом, с учетом общепринятых значений ван-дер-ваальсовых радиусов атомов, наличие симбатности общего молекулярного объема и экстрагируемости.

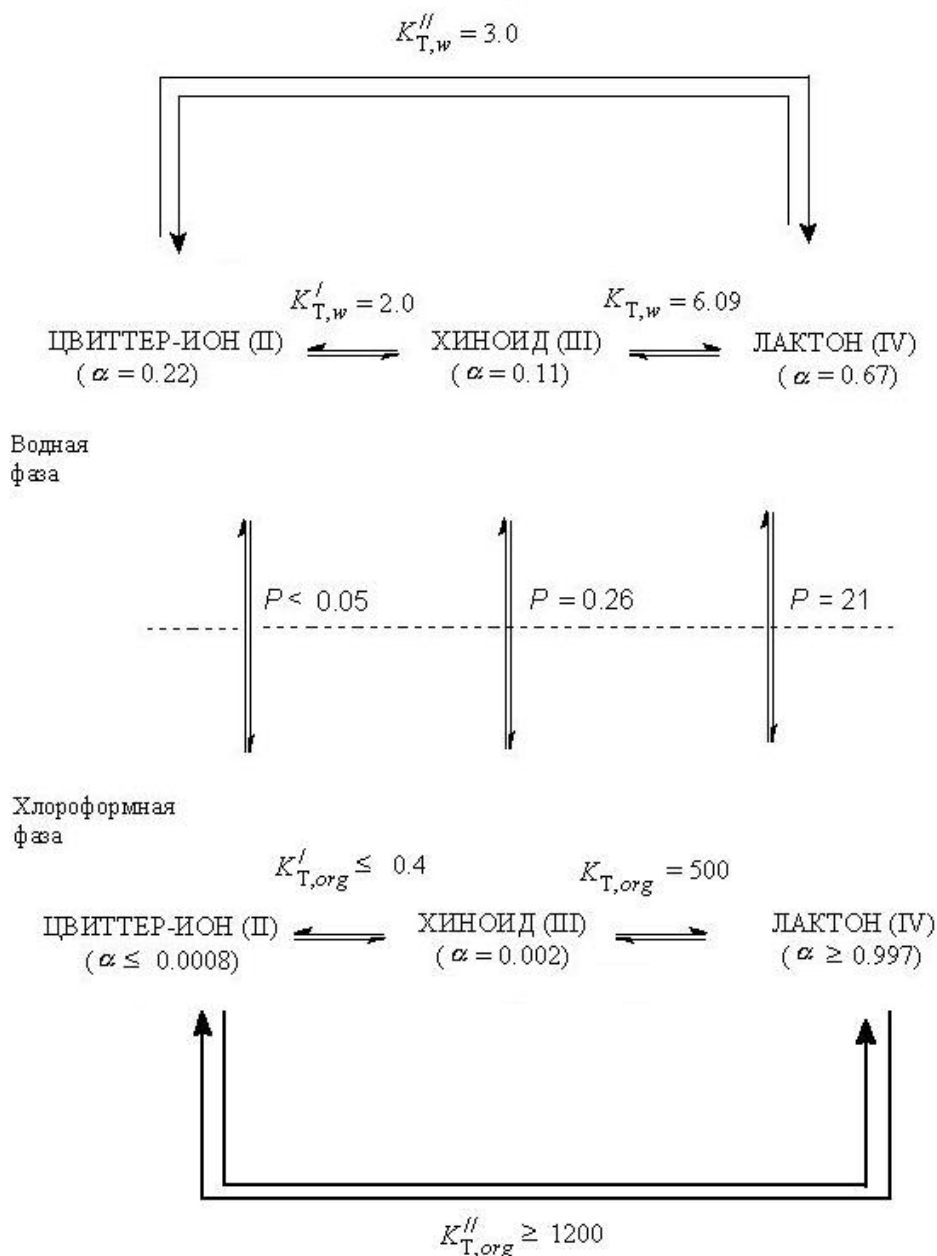


Схема 3. Таутомерия флуоресцеина в двухфазной системе вода/хлороформ.

Экстракция из воды в хлороформ анионов HR^- в виде ионных ассоциатов с катионами тетрафениларсония, тетра-*n*-бутиламмония и краун-эфирными комплексами металло-ионов была применена нами как способ изоляции анионов из равновесной смеси форм, сосуществующих в водном растворе даже при рН максимального выхода [243,423-425]. Моноанионы флуоресцеина, сульфифлуоресцеина и 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина извлекаются в виде структур типа V, а красители, содержащие галогены в положениях 2,4,5 и 7 – эозин, эритрозин, бенгальский розовый А и бенгальский розовый Б – в виде структур типа VI. Значения λ_{max} экстрактов ионных ассоциатов представлены в таблице 20, а типичные спектры – на рисунке 31.

2,7-Дихлорфлуоресцеин в этом случае занимает промежуточное положение. С учетом того, что при переходе к неводному окружению значение K_{Tx} должно возрастать в соответствии с ур. (28), можно считать, что в воде для красителей первой группы структуры типа VI тем более не свойственны. Правда, нужно учитывать и то, что в экстрактах ионы связаны в ассоциаты с противоионами, и в этом случае группы COO^- могут образовывать более устойчивые пары с катионами, что может дополнительно стабилизировать таутомеры типа V.

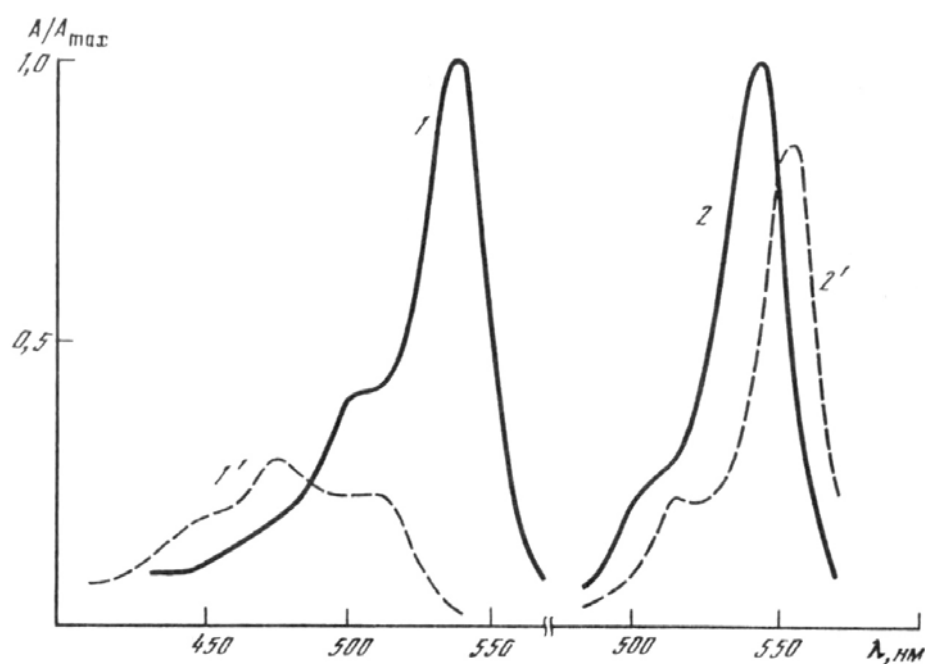


Рис. 31. Спектры хлороформных экстрактов ионных ассоциатов 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина (1,1') и эритрозина (2,2') с ионами тетрафениларсония: 1,2 – $R^2-(TFA^+)_2$; 1',2' – HR^-TFA^+ [423].

11. Взаимодействие флуоресцеиновых красителей с ионами металлов и поведение их в лиофобных коллоидных системах

В разделах 2 и 5 уже говорилось о реакциях анионов ксантеновых красителей с ионами металлов. Здесь нас будут интересовать главным образом такие взаимодействия в водных растворах, которые приводят к образованию осадков и коллоидных систем.

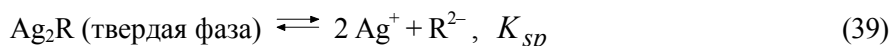
Цветовые реакции с ионами металлов изучены в основном для органических реагентов типа хромофорных комплексонов, хелатообразующих окси-азосоединений и т.п. и в гораздо меньшей степени для реагентов, не содержащих специфических на данный ион металла групп. Примером таких соединений как раз и являются флуоресцеиновые красители. Для моделирования и оптимизации процессов в неорганическом анализе, фотохимии и других областях применения красителей необходимы данные о составе, прочности и спектральных характеристиках продуктов их взаимодействия с ионами металлов в растворах. Эти взаимодействия могут иметь место (и должны быть учтены) и в более сложных системах, например, при образовании ионных ассоциатов («тройных комплексов») в экстракционных и безэкстракционных системах, в которых главным предметом изучения является взаимодействие анионов красителей не

с ионами металлов, а с комплексами последних с электронейтральными лигандами (такими, как фенантролин, краун-эфиры или криптанды).

Как известно [36-39,331-335,427], галогенпроизводные флуоресцеина образуют ионные ассоциаты с ионами РЗЭ и переходных металлов. В водных боратных буферных растворах в присутствии комплексных ионов $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ дианион R^{2-} эритрозина в триплетном состоянии участвует в реакции переноса электрона, превращаясь в трехзарядный анион [428]. Известны аномальные магнитные свойства комплексов флуоресцеина с Fe^{2+} и Fe^{3+} , выделены в твердом состоянии комплексы с Mn^{2+} , Cu^{2+} , ионами ванадила [429-431]. Обнаружены полупроводниковые свойства комплексов флуоресцеина и дихлорфлуоресцеина с РЗЭ [432]. Сложный характер носит взаимодействие в системе вода – нитрат лантана – бенгальский розовый Б (Na_2R), приводящее к образованию твердой фазы [433].

Нами совместно с Л. П. Логиновой было исследовано взаимодействие флуоресцеина и его галогенпроизводных с ионами Ag^+ в водных растворах [372,434,435]. Литературные данные, опубликованные разными авторами, противоречивы. Так, еще в 1943 году сообщалось о появлении новой полосы поглощения при взаимодействии эритрозина с ионами серебра, а единственным продуктом взаимодействия считалась малорастворимая высокодисперсная соль Ag_2R [75]; там же дан обзор более старых работ, посвященных изучению сенсibilизации фотоэмульсии эозином и эритрозином. С. Шеппардом с сотрудниками получены значения растворимости свежееосажденного эритрозината серебра от $4.5 \cdot 10^{-6}$ до $2.5 \cdot 10^{-5}$ М в зависимости от метода исследования (спектрофотометрия, потенциометрическое титрование) [75]. В других работах при взаимодействии галогенпроизводных флуоресцеина с Ag^+ наблюдалось лишь понижение основной длинноволновой полосы поглощения красителя [135,436]. С другой стороны, методом тушения флуоресценции установлено, что ионы Ag^+ образуют с флуоресцеином и его производными комплексы со стехиометрическим соотношением 1 : 1 [437]. Имеются данные о значениях показателей произведения растворимости ($\text{p}K_{\text{sp}}$) эозината и флуоресцеината серебра: 8.9 [73] и 6.6 [438] соответственно.

На основании данных потенциометрического титрования с использованием стеклянного электрода ЭСЛ 51-07 с серебряной функцией (рис. 32) нами определены значения произведения растворимости солей Ag_2R :



Было показано, что над осадком практически отсутствуют продукты взаимодействия с другой стехиометрией. Значения $\text{p}K_{\text{sp}}$, рассчитанные по программе SOLEX, представлены в таблице 21. Для эозина зафиксировано также наличие гомогенного равновесия ($2 \text{Ag}^+ + \text{R}^{2-} \rightleftharpoons \text{Ag}_2\text{R}$).

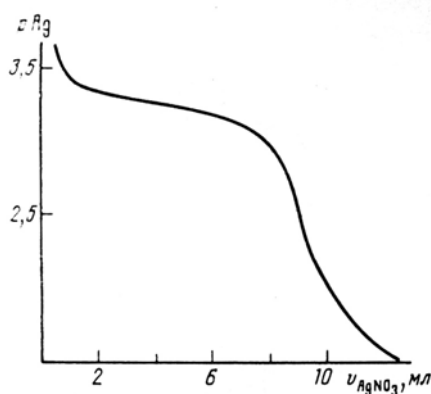


Рис. 32. Кривая потенциометрического титрования 10.00 мл водного раствора эозина (0.0896 М) водным раствором AgNO_3 (0.200 М) [372,435].

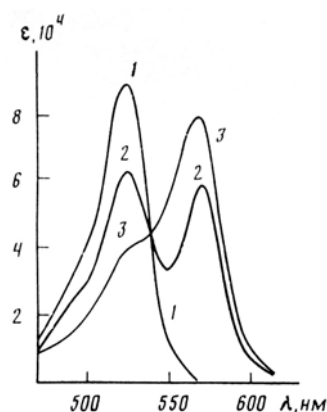


Рис. 33. Спектры поглощения водных растворов эритрозина ($5 \cdot 10^{-5}$ М) в условиях доминирования формы R^{2-} (pH = 9.2): 1 – в отсутствие ионов Ag^+ ; 2 – $5 \cdot 10^{-5}$ М AgNO_3 ; 3 – $1 \cdot 10^{-4}$ М AgNO_3 [372,435].

Таблица 21. Значения показателей произведения растворимости серебряных солей гидроксисантеновых красителей, найденные при помощи потенциометрического метода [372,434,435]

Краситель	pK_{sp}	
	$I = 0.001 \text{ M}$	$I = 0.1 \text{ M (KNO}_3\text{)}$
Эозин	—	$8.07 \pm 0.06^*$
4,5-Диодфлуоресцеин	≈ 12.7	—
Эритрозин	14.9 ± 0.2	14.87 ± 0.06
Бенгальский розовый Б	14.5 ± 0.1	14.34 ± 0.07

* Без добавок нитрата калия, но при начальных концентрациях R^{2-} и Ag^+ , равных соответственно 0.0896 М и 0.2 М. При $I = 0.1 \text{ M (KNO}_3\text{)}$ и концентрациях реагентов порядка 10^{-3} M осадок не выпадает в течение нескольких дней; показано, что в этих условиях единственным продуктом взаимодействия ионов Ag^+ с дианионами эозина R^{2-} является растворимая форма Ag_2R (логарифм константы устойчивости: 5.32 ± 0.05).

Для иодпроизводных флуоресцеина в отсутствие видимого осадка в электронных спектрах поглощения наблюдается новая полоса, смещенная bathochromно на 40-50 нм относительно максимума полосы иона R^{2-} (рис. 33), что связано с коллоидным состоянием нефлуоресцирующих продуктов взаимодействия (Ag_2R).

Цвет растворов иодпроизводных флуоресцеина с молярной концентрацией красителя $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ изменяется при добавлении равных количеств $AgNO_3$, однако осадок не образуется в течение нескольких часов. Для свежеприготовленных растворов спектрофотометрическое исследование привело к стехиометрическому соотношению Ag^+ и R^{2-} , равному 2 : 1. В целом результаты, полученные методами потенциометрии и спектрофотометрии, неплохо согласуются между собой.

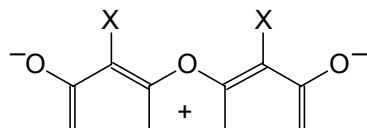
Выпадению осадка способствует избыток $AgNO_3$, введение фонового электролита (KNO_3) и длительное хранение растворов. Все эти факторы, приводящие в конечном счете к выпадению осадка, способствуют и синему смещению новой полосы поглощения на 5-15 нм. Особенно легко выпадает фиолетовый осадок серебряной соли в случае бенгальского розового Б. Отсутствие новой полосы или слабо выраженное поглощение продукта взаимодействия может быть вызвано как тем, что опыты проведены в условиях избытка нитрата серебра, вызывающего коагуляцию продукта реакции [135], так и тем, что рабочие концентрации реагентов слишком малы для обеспечения заметного выхода Ag_2R [436].

Подробности эксперимента можно найти в депонированной статье [372]. ИК спектры твердых препаратов серебряных солей эозина и эритрозина сходны со спектрами динариевых солей этих же красителей (см. раздел 6). В них отсутствуют полосы в области 1750 cm^{-1} и 1710 cm^{-1} , имеющиеся в спектрах нейтральных форм красителей и отвечающие валентным колебаниям групп $C=O$ лактонного цикла и карбоксильной группы, соответственно. Это доказывает участие карбоксилатной группировки в солеобразовании и согласуется с данными об ИК спектрах серебряной соли 2,7-дихлорфлуоресцеина [438].

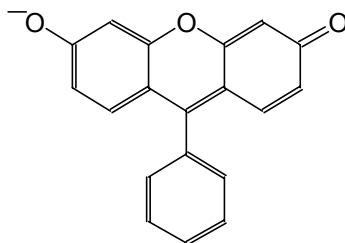
Полученные результаты позволили уточнить механизм действия индикаторов Фаянса в аргентометрическом титровании. В частности, показано [434], что представления о послеосаждении вблизи точки эквивалентности серебряной соли индикатора Ag_2R плохо согласуются с данными об адсорбции потенциалопределяющих ионов на осадках галогенидов серебра. Более правдоподобны представления об адсорбции анионов флуоресцеиновых красителей с диссоциированной гидроксигруппой, в частности, дианионов R^{2-} флуоресцеина и эозина и моноанионов HR^- эозина (но не флуоресцеина) на осадках галогенидов серебра путем обмена на ионы галогенов.

Такой подход позволил также объяснить остававшийся ранее непонятным характер влияния pH при использовании индикаторов Фаянса в водных растворах. Верхний предел оптимальной кислотности для индикации конечной точки титрования в аргентометрическом титровании анионов галогенов ($pH = 10$) обусловлен осаждением Ag_2O . При сопоставлении нижних пределов для разных индикаторов возникает вопрос о том, какая именно ионная форма красителя взаимодействует с поверхностью осадка галогенида серебра, обеспечивая индикацию конечной точки титрования.

Так, флуоресцеин применяют для индикации конечной точки титрования при $\text{pH} > 6.5$, что соответствует области преобладания формы R^{2-} . Эозин рекомендуется использовать в гораздо более кислых растворах, начиная с $\text{pH} = 2$ [72]; при этом доля красителя, находящегося в растворе в виде дианиона R^{2-} , составляет примерно 0.3 %, а в виде ионов HR^- – около 15%. Различие нижних пределов оптимальной кислотности для этих двух красителей можно объяснить, учитывая особенности таутомерии ионов HR^- . Способность индикатора изменять окраску при взаимодействии с поверхностью частиц осадка галогенида серебра обусловлена, видимо, локализацией отрицательного заряда на ксантеновом остоле:



Это подтвердилось специально поставленными экспериментами, в ходе которых было показано, что использование аниона 6-гидрокси-9-фенилфлуорона



имеющего аналогичную хромофорную систему, но не содержащего карбоксильной группы, обеспечивает переход окраски вблизи конечной точки титрования раствора хлорида раствором нитрата серебра [434].

В случае флуоресцеина моноанион HR^- в растворе представлен исключительно таутомером V (см. схему 1), отрицательный заряд которого полностью локализован на группе COO^- . Диссоциация группы OH происходит лишь на стадии образования дианиона R^{2-} . Для эозина, напротив, отрицательно заряженная хромофорная система возникает уже на стадии образования моноаниона HR^- (таутомер VI, см. схему 1).

При $\text{pH} = 2$ преобладающей формой эозина в воде является нейтральная форма H_2R , окрашивающая раствор в желтый цвет; ионы HR^- и R^{2-} имеют розовую окраску с желто-зеленой флуоресценцией. Поверхность осадка галогенида серебра при взаимодействии с эозином окрашивается в розовый цвет. Поэтому значение $\text{pH} = 2$ при титровании с эозином не только возможно, но и желательно, так как способствует более контрастному переходу окраски.⁴

По степени диссоциации гидроксигруппы в моноанионе HR^- красители 2,7-дихлорфлуоресцеин и 4,5-дибромфлуоресцеин занимают промежуточное место между флуоресцеином и эозином. Такое же место занимают они как в «ряду Фаянса» [5], так и по значению нижнего предела кислотности, оптимальной для индикации конечной точки: $\text{pH} \approx 4$.

Анионы эритрозина слишком сильно адсорбируются на поверхности галогенидов серебра, и этот индикатор неприменим для титрования ионов Cl^- , Br^- и I^- в воде [5]. Но использование в качестве рабочей среды водно-органических смесей делает возможным применение и эритрозина [439].

⁴ Другими словами, различие нижних пределов оптимальной кислотности при использовании флуоресцеина и эозина можно объяснить, исходя из значений $\text{pK}_{a2} = 6.8$ и $\text{pK}_{a1} = 2.8$ для флуоресцеина и эозина, соответственно. Таким образом, получен ответ на вопрос о целесообразности добавления уксусной кислоты до $\text{pH} = 2$ при титровании раствора иодида калия раствором нитрата серебра с эозином в качестве адсорбционного индикатора, т.е. на вопрос, постановка которого стимулировала в 1975 году интерес автора данной статьи к проблеме протолитических равновесий гидроксиксантеновых красителей (см. раздел 1).

В заключение этого раздела следует отметить, что систематически появляются публикации, посвященные поведению гидроксиксантенов на твердых поверхностях, в частности, на поверхностях коллоидных частиц лиофобных гидрозолей. Например, исследовались рамановские спектры эозина и продукта его окисления, адсорбированных на коллоидных частицах TiO_2 [440], и резонансно усиленные рамановские спектры 4'-аминофлуоресцеина и 4,5-дииод-4'-иодацетамидофлуоресцеина на частицах гидрозоля серебра [441]. В обоих случаях при интерпретации результатов использовались значения pK_a красителей в растворах; вероятно, необходимо располагать еще и данными о протолитических свойствах в адсорбированном состоянии. Строение адсорбционных слоев флуоресцеина, эозина и родамина Б на металлическом золоте в контакте с 0.1 М водным раствором HClO_4 изучено методами сканирующей туннельной микроскопии и циклической вольтамперометрии [442]. При этом выявлена димеризация красителей в адслоях. Впрочем, флуоресцеин при этом изображен в виде хиноидного таутомера III, в то время как в столь кислой среде вполне вероятно образование катиона H_3R^+ (I). Недавно опубликованы данные о фотоозонолизе адсорбированного эозина на поверхности кремнезема [443]; перечень новых исследований, связанных с адсорбированным состоянием гидроксиксантенов, легко может быть продолжен.

12. Флуоресцеиновые красители в организованных растворах

Мицеллярные растворы коллоидных ПАВ и родственные им системы, такие, например, как микроэмульсии и суспензии липосом фосфолипидов, являются своеобразными растворителями, обладающими целым рядом особенностей. Вместе с растворами супрамолекул (например, циклодекстринов) они относятся к так называемым организованным растворам [320]. Для исследования подобных систем, в частности, для мониторинга поверхностных электрических потенциалов Ψ и для контроля поверхностной кислотности флуоресцеиновые красители применяются довольно широко [96,97,159,203,259,320]. О важности обсуждаемых нами красителей для изучения лиофильных дисперсий уже говорилось в разделе 1. Поэтому ниже мы изложим результаты наших исследований протолитических и спектральных свойств гидроксиксантенов в мицеллярных растворах ПАВ, но вначале рассмотрим основные соотношения, описывающие кислотно-основные равновесия в таких системах.

Леофильные дисперсии и прочие организованные растворы как среды для химических реакций. Поверхностная кислотность. Даже занимая лишь тысячные доли общего объема раствора, лиофильные дисперсии на основе ПАВ способны коренным образом изменить характер протекания различных процессов. Согласно общепринятой точке зрения, мицеллы, появляющиеся в растворах ПАВ по достижении ККМ, представляют собой высокопористые, сильно гидратированные разупорядоченные кластеры, находящиеся в состоянии динамического равновесия с объемной фазой. Леофильность мицеллярных растворов ПАВ и родственных им систем позволяет применить термодинамический подход, основанный на концепции псевдофазы. Возникают равновесия, характерные как для гомогенных, так и для гетерогенных систем [320].

Среди катионных ПАВ широко применяется цетил-триметиламмоний бромид (ЦТАБ) сферические мицеллы которого, по данным различных авторов, имеют радиус 2.6-3.5 нм. Сходными свойствами обладают цетил-триметиламмоний хлорид (ЦТАХ) и *N*-цетилпиридиний хлорид (ЦПХ). Среди анионных ПАВ наибольшее распространение получил *n*-додецилсульфат натрия (ДСН). Радиус его сферических мицелл: 1.8-2.0 нм. Область Штерна мицелл ионных ПАВ, в которой, как правило, локализованы индикаторные красители, достаточно хорошо гидратирована; обычно от 50 до 80 % поверхностно-активных ионов нейтрализовано противоионами. Одна-две метиленовые группы углеводородных радикалов входят в эту область; концентрация электролита (ионных головок и противоионов) составляет здесь несколько молей в литре.

В случае традиционных неионных ПАВ гидрофильная часть представляет собой полиоксипропиленовую цепочку $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$. Такая оболочка, экранирующая углеводородное «ядро» от водной фазы, может быть весьма объемистой. Размеры капель микроэмульсий и липосом фосфолипидов могут на порядок и более превышать размеры сферических мицелл ПАВ.

Ключевыми являются концепции «псевдофазы» (что подчеркивает условность применения понятия «фаза» к мицеллам ПАВ) и «кажущейся» (apparent) константы диссоциации индикатора:

$$pK_a^a = pH_w + \lg \{[HB]_t / [B]_t\} \quad (40)$$

Индекс t (total) означает, что концентрация выражается в молях на литр всего раствора. Значения pH_w характеризуют водную (объемную) фазу и определяются, как правило, потенциометрически, со стеклянным электродом в цепи с переносом, а отношение равновесных концентраций сопряженных форм индикатора устанавливается спектрофотометрически. При этом концентрации выбирают таким образом, чтобы на один ансамбль молекул ПАВ приходилось не более одной молекулы индикатора; «репортерные» свойства красителей, интенсивно поглощающих свет, а также способных люминесцировать, вполне реализуются при очень малых их концентрациях.

В общем случае K_a^a – это константа двухфазного кислотно-основного равновесия, в отличие от констант K_a в неводных растворителях, рассмотренных выше. Обычно в подобных исследованиях доля объема, занимаемого мицеллами, составляет не более 1%, остальная же часть приходится на воду.

По существу, мы имеем дело с особым типом равновесий, характерным для организованных растворов, наделенных чертами как гомогенной, так и гетерогенной систем.

Отклонение pK_a^a от «водного» значения (pK_a^w) для данного индикатора наряду со спектрами поглощения и флуоресценции, а также временами жизни возбужденного состояния красителей дает богатую информацию о свойствах псевдофазы.

Рассмотрим основные количественные соотношения. Распределение любых ионов и молекул между объемной (водной) фазой и псевдофазой (микрофазой, мицеллярной фазой) в рамках электростатической модели описывается константой P_i :

$$P_i = \frac{a_i^m}{a_i^w} = \frac{[i_m]f_i^m}{[i_w]f_i^w} = \gamma_i^{-1} e^{-z_i \Psi F / RT} \quad (41)$$

Здесь f_i^m и f_i^w – концентрационные коэффициенты активности в мицеллярной и водной фазах, соответственно, γ_i – коэффициент активности переноса из воды в псевдофазу, Ψ – электрический потенциал в области локализации данной частицы, z_i – ее заряд; индексы m и w обозначают принадлежность к мицеллярной и водной фазам, соответственно. Параметр γ_i связан с адсорбционным потенциалом Штерна, Φ_i , соотношением $\gamma_i = \exp(\Phi_i / RT)$. Поскольку вопрос о стандартизации активностей в псевдофазе довольно сложен, часто в качестве a_i^m используют равновесную концентрацию $[i_m]$.

Для кажущейся константы диссоциации в условиях полного (complete) связывания обеих форм индикатора псевдофазой, K_a^{ac} , справедливо:

$$pK_a^{ac} = pK_a^w + \lg P_{HB} - \lg P_B = pK_a^w + \lg \frac{\gamma_B}{\gamma_{HB}} + \lg \frac{f_B^m}{f_{HB}^m} - \frac{\Psi F}{2.302RT} \quad (42)$$

Значения f_B^m / f_{HB}^m обычно принимают равными единице [259,320]. Фактически это может означать, что эффекты, отражающие изменения ионного состава области Штерна, включаются в значения γ_i .

Первые два слагаемых ур. (42) принято обозначать через pK_a^i . Внутренняя (intrinsic) константа K_a^i связана с константой равновесия в мицеллярной фазе, K_a^m ($K_a^m = a_{H^+}^m a_B^m / a_{HB}^m$), соотношением: $pK_a^i = pK_a^m - \lg \gamma_{H^+}$. При моделировании мицеллярного микроокружения органическими растворителями именно величина pK_a^m должна приравниваться величине pK_a в неводных (водно-органических) средах. С учетом вышеуказанных допущений имеем:

$$pK_a^{ac} = pK_a^i - \frac{\Psi F}{2.302RT} \quad (43)$$

Эффекты среды (изменения значений pK_a^{ac} по сравнению с pK_a^w) обозначим через ΔpK_a^{ac} : $\Delta pK_a^{ac} = pK_a^{ac} - pK_a^w$.

Протолитические равновесия гидроксиксантеновых красителей в мицеллярных растворах ПАВ. К настоящему времени нами достаточно подробно исследованы протолитические равновесия гидроксиксантеновых красителей в мицеллярных растворах катионных [243,259,260,322,325,338,444-447] и анионных ПАВ [243,259,312,325,448,449]; исследована также диссоциация родамина Б в растворах анионного и неионных ПАВ [450]. Определены значения pK_a^a флуоресцеина и его производных в мицеллярных растворах неионных ПАВ [243,259,444,451-454], цвиттерионного ПАВ цетил-диметиламмонийпропансульфоната [259], в смешанных мицеллярных растворах ионных и неионных ПАВ [259,325,455] и суспензиях фосфолипидов [259,454].

Некоторые значения pK_a^a флуоресцеиновых красителей в мицеллярных растворах катионных ПАВ представлены в таблицах 22 и 23.

Спектры поглощения ионов R^{2-} и HR^- флуоресцеина, эозина и бенгальского розового Б в мицеллярных растворах катионного ПАВ представлены на рис. 34, а нейтральных форм H_2R флуоресцеиновых красителей в воде и в мицеллярных растворах *N*-цетилпиридиний хлорида – на рис. 35.

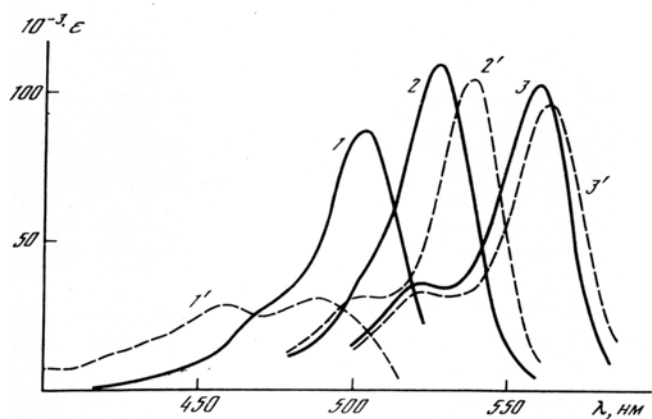


Рис. 34. Спектры поглощения ионов R^{2-} (1-3) и HR^- (1'-3') флуоресцеина (1,1') и эозина (2,2') в мицеллярных растворах *N*-цетилпиридиний хлорида и бенгальского розового Б (3,3') в мицеллярных растворах цетилтриметиламмоний бромида; $I = 0.05$ M [445,446].

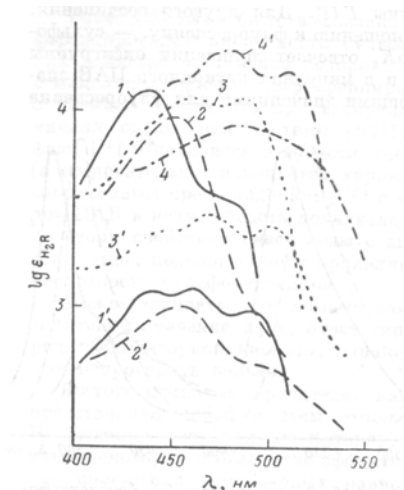


Рис. 35. Спектры нейтральных форм H_2R флуоресцеиновых красителей в воде (1-4) и в мицеллярных растворах *N*-цетилпиридиний хлорида (1'-4'); 1,1' – флуоресцеин; 2,2' – 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеин; 3,3' – 2,7-дихлорфлуоресцеин; 4,4' – эозин [445].

При общем снижении значений pK_a^a по сравнению со значениями pK_a^w , обусловленном положительным зарядом поверхности мицелл, имеют место батохромные сдвиги полос поглощения анионов (особенно дианионов R^{2-} и «фенолятных» моноанионов типа VI) и смещения положений таутомерных равновесий нейтральной формы – от хиноидов III в сторону лактонов IV. Цвиттерионы флуоресцеина, 3',4',5',6'-тетрахлорфлуоресцеина и флуоресцеин-изотиоцианата, наблюдающиеся в водном растворе, отсутствуют в мицеллярных растворах ПАВ, а моноанион HR^- 2,7-дихлорфлуоресцеина из «карбоксилатного» таутомера V, преобладающего в воде, превращается в «фенолятный» таутомер VI. В мицеллах катионных ПАВ значения pK_{a1}^a и pK_{a2}^a флуоресцеина сближаются, а эозина – расходятся по сравнению со значениями в водном растворе.

Таблица 22. Значения показателей кажущихся констант диссоциации гидроксиксантоновых красителей в мицеллярных растворах катионных ПАВ [259,260,322,338,445,446] ^а

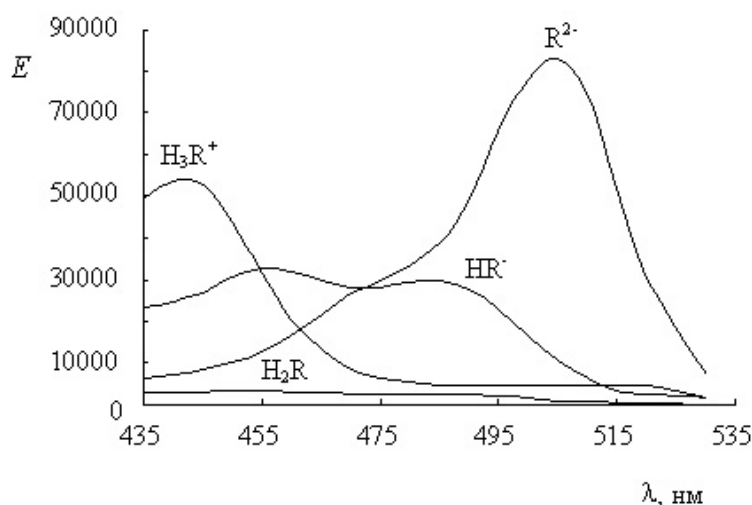
Краситель	Мицеллярный раствор ЦПХ, 0.05 М КСl					Мицеллярный раствор ЦТАХ, 4.0 М КСl					
	pK_{a0}^a	pK_{a1}^a	pK_{a2}^a	ΔpK_{a1}^a	ΔpK_{a2}^a	pK_{a0}^a	pK_{a1}^a	pK_{a2}^a	ΔpK_{a0}^a	ΔpK_{a1}^a	ΔpK_{a2}^a
Флуоресцеин	0.98 ± 0.06	3.60 ± 0.05	5.54 ± 0.11	-0.85	-1.26	—	6.41 ± 0.10	7.17 ± 0.06	—	1.96	0.37
Флуоресцеин-изотиоцианат ^{б,в}	1.36 ± 0.18	4.31 ± 0.01	6.00 ± 0.01	-0.08	-0.87	—	—	—	—	—	—
Тиофлуоресцеин ^{б,г}	0.37 ± 0.03	4.80 ± 0.08	5.60 ± 0.03	0.09	-0.99	0.55 ± 0.09	7.67 ± 0.06	7.77 ± 0.12	-1.44	2.96	1.18
Сульфифлуоресцеин	—	0.9 ± 0.1	5.46 ± 0.07	-2.32	-1.30	—	2.33 ± 0.05	7.00 ± 0.01	—	-0.89	0.24
6-Гидрокси-9-фенилфлуорон	1.1 ± 0.1	4.67 ± 0.07	—	-1.61	—	1.98 ± 0.04	6.67 ± 0.03	—	-1.12	0.39	—
Этилфлуоресцеин	—	—	—	—	—	1.86 ± 0.02	6.59 ± 0.03	—	-1.08	0.28	—
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	—	3.55 ± 0.06	5.38 ± 0.03	-0.10	-1.17	—	—	—	—	—	—
2,7-Дихлорфлуоресцеин	—	3.58 ± 0.08	3.70 ± 0.12	-0.42	-1.49	—	5.50 ± 0.03	5.79 ± 0.05	—	1.50	0.60
Эозин	—	0.5 ± 0.1	2.82 ± 0.07	-2.31	-0.93	—	1.81 ± 0.15	5.89 ± 0.07	—	-1.00	2.14
Этилэозин	—	0.0 ± 0.1	—	-1.8	—	—	1.11 ± 0.03	—	—	-0.69	—
2,4,5,7-Тетранитрофлуоресцеин	—	—	—	—	—	—	0.16 ± 0.03	1.45 ± 0.02	—	—	—

^а Концентрация ПАВ: 0.003 М. ^б Изомер I. ^в Ионная сила 0.05 М создавалась добавками NaCl. ^г Ранее неопубликованные данные при $I = 4.00$ М получены Н. А. Водолазкой.

Таблица 23. Значения pK_a^a ($\pm (0.06-0.12)$) эритрозина и бенгальского розового Б в мицеллярных растворах ЦТАБ (0.003 М) [325,446,447]^a

Условия	Эритрозин		Бенгальский розовый Б	
	pK_{a1}^a	pK_{a2}^a	pK_{a1}^a	pK_{a2}^a
0.05 М КВr	1.03	4.30	1.88	3.14
2 М КВr	1.94	6.09	3.10	4.06
Разность	0.91	1.79	1.22	0.92

В отдельных случаях сдвиг положения таутомерного равновесия в сторону лактона IV столь значителен, что даже при низкой ионной силе водной фазы (т.е. при достаточно высоких значениях Ψ) возможен рост значения pK_{a1}^a по сравнению со значением pK_{a1} в воде; это имеет место, в частности, для тифлуоресцеина (табл. 22).

**Рис. 36.** Спектры поглощения ионных форм флуоресцеин-изотиоцианата (изомер I) в мицеллярных растворах *N*-цетилпиридиний хлорида; $I = 0.05$ М, за исключением спектра катиона [260].

Таким образом, наблюдаются все эффекты, характерные для неводных сред. Вообще, аналогия между мицеллярной псевдофазой и органическими растворителями является общепринятой [129,456-460], хотя попытки моделирования сольватационных свойств мицелл свойствами водно-органических смесей на количественном уровне полного успеха пока не принесли [259,320].

Параметры протолитических равновесий флуоресцеина и его производных в микроэмульсии на основе катионного ПАВ (ЦПХ – пентанол-1 – бензол – вода) [461,462] близки по своим значениям параметрам равновесий в мицеллах катионных ПАВ.

Нейтральные формы красителей связываются мицеллами катионных (как впрочем и всех прочих) ПАВ по причине малой растворимости в воде. При этом сдвиг положения таутомерных равновесий сам по себе является доказательством такого связывания. Все анионные формы красителей связываются катионными мицеллами прежде всего за счет электростатического притяжения. Лишь катионные формы некоторых красителей связываются такими мицеллами незначительно или практически не связываются. При повышении ионной силы водной фазы до 4 М значения показателей констант диссоциации, в частности, pK_{a1}^a и pK_{a2}^a , увеличиваются из-за экранирования поверхностного заряда мицелл и снижения значения Ψ .

Во всех случаях уравнения (15)-(18) и (21)-(28) адекватно описывают соотношение значений констант диссоциации, таутомеризации и микроконстант диссоциации, k , гидроксиксантонов в мицеллярных растворах катионных ПАВ, с учетом дополнительного электростатического фактора (слагаемое $-\Psi F/2.3RT$). При этом выявилось сильное дифференцирующее действие мицеллярной псевдофазы по отношению к диссоциации красителей, напоминающее аналогичное действие водно-ацетоновых или водно-диметилсульфоксидных смесей.

В мицеллярных растворах неионных ПАВ [259,325,455] связывание анионных форм уже не столь бесспорно; так, дианион R^{2-} флуоресцеина практически не связывается мицеллами неионных ПАВ. Но в случае более гидрофобных галогенпроизводных анионы связываются достаточно полно, и при этом, в частности, наблюдается сдвиг положения таутомерного равновесия моноаниона HR^- 2,7-дихлорфлуоресцеина ($V \rightleftharpoons VI$) вправо (рис. 37). Значения pK_{a1}^a и pK_{a2}^a некоторых флуоресцеиновых красителей в мицеллярных растворах неионного ПАВ представлены в таблице 24. Эти значения по сравнению со значениями в воде сближаются в случае флуоресцеина, а в двух других случаях зарегистрирована даже инверсия кажущихся констант ступенчатой диссоциации. В то же время в случае эозина и эритрозина значения pK_{a1}^a и pK_{a2}^a различаются на 2.6-3.4 единицы.

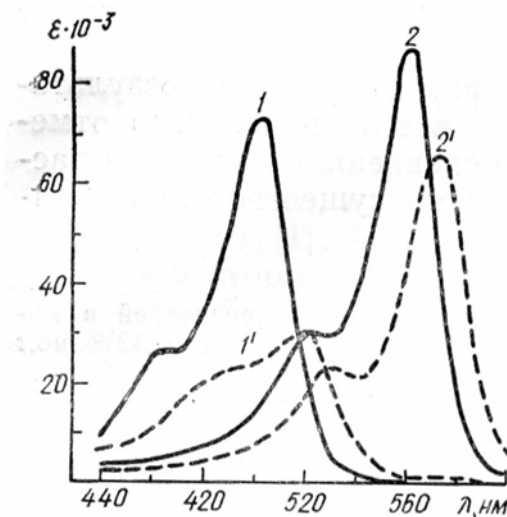


Рис. 37. Спектры форм R^{2-} (1,2) и HR^- (1',2') 2,7-дихлорфлуоресцеина (1,1') и бенгальского розового Б (2,2') в мицеллярных растворах неионного ПАВ нонилфенола 12 [453].

Таблица 24. Значения показателей кажущихся констант диссоциации гидроксиксантовых красителей в мицеллярных растворах неионного ПАВ нонилфенола 12 [453]; 25 °C^a

Краситель	pK_{a1}^a	pK_{a2}^a	$E_{\max} 10^{-3} (H_2R)$
Флуоресцеин	5.98 ± 0.05	6.78 ± 0.05	0.53
3',4',5',6'-Тетрахлорфлуоресцеин	6.92 ± 0.08	6.37 ± 0.07	0.78
2,7-Дихлорфлуоресцеин	6.08 ± 0.08	5.54 ± 0.07	0.72
Эозин	3.22 ± 0.05	5.84 ± 0.08	2.2
Эритрозин	2.81 ± 0.02	6.18 ± 0.04	7.52
Бенгальский розовый Б	3.54 ± 0.08	4.24 ± 0.04	0.44

^a Концентрация ПАВ: 2.8 г/л, $I = 0.05$ M (NaCl + буфер).

Интересно, что расположение красителей в ряд по степени превращения нейтральных форм H_2R в мицеллярных средах в лактоны IV (табл. 24) соответствует аналогичным закономерностям, выявленным для водно-органических смесей и безводных растворителей (см. раздел 5).

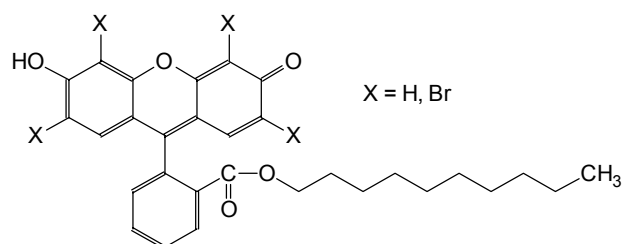
Сближение значений pK_{a1}^a и pK_{a2}^a флуоресцеина, обусловленное сдвигом таутомерного равновесия нейтральной формы в сторону лактона и более резким ростом значения pK карбоксильной группы по сравнению с pK гидроксигруппы наблюдается при переходе от водных растворов к самым различным неводным средам.

Так, в работе М. Чои исследовано поведение флуоресцеина в пленке этилцеллюлозы [180]. Ион R^{2-} вносится в пленку в виде толуольного экстракта тетра-*n*-октиламмониевой соли; $\lambda_{\max} (R^{2-}) = 510$ нм. Исследовались зависимости поглощения и испускания света от pH водной фазы, в которую погружалась этилцеллюлозная пленка. Нейтральная форма практически бесцветна, что говорит о сдвиге таутомерного равновесия в пленке в сторону лактона. Два перехода сли-

ваются, и полупревращению H_2R в R^{2-} отвечает $pH = 5.0$ как в спектрах поглощения, так и в спектрах флуоресценции.

Имеются данные и о протолитических свойствах эозина в присутствии метилцеллюлозы [112]. Впрочем, неясно, почему вместо значений pK_{a1}^a и pK_{a2}^a в этой работе приводятся три значения pK_a (2.10, 2.85 и 4.95).

Полное связывание красителей мицеллами ПАВ практически любого типа можно обеспечить введением длинного углеводородного радикала. Так, сложные *n*-дециловые эфиры флуоресцеина и эозина:



были использованы для исследования мицелл катионных, анионных, неионных и цвиттерионных ПАВ [259,448,449,454,455], а также липосом фосфолипидов [259,454]. Возможно также введение гидрофобного углеводородного радикала в положение 4', исходя из 4'-аминофлуоресцеина; при этом не затрагивается карбоксильная функция $COOH$ и сохраняется возможность образования лактонного цикла [159].

На отрицательно заряженной поверхности мицелл анионных ПАВ значения pK_a^a под влиянием электростатического фактора (слагаемое $-\Psi F/2.3RT$, $\Psi < 0$) вообще говоря повышаются по сравнению со значениями в водных растворах.

Даже при отсутствии длинного углеводородного радикала анионные формы красителей могут связываться анионными мицеллами. Это достигается за счет высокой общей гидрофобности; так, в молекуле бенгальского розового Б имеется восемь атомов галогенов, и вследствие этого не только молекулы H_2R , но и анионы HR^- и R^{2-} этого красителя практически полностью связываются мицеллами *n*-додецилсульфата натрия и других анионных ПАВ [325]. В таблице 25 собраны значения параметров протолитических равновесий бенгальского розового Б в анионных мицеллах.

Таблица 25. Условия эксперимента и результаты определения параметров равновесий бенгальского розового Б в мицеллярных растворах *n*-додецилсульфата натрия при 25 °C [325]

Параметр	Значение параметра
Концентрация красителя	$7.0 \cdot 10^{-6}$ М
Концентрация <i>n</i> -додецилсульфата натрия	0.05 М
I (NaCl + буфер) ^a	0.05 М
ККМ при $[Na^+] = 0.05$ М	0.002 М
Рабочий диапазон pH ^б (число растворов)	0 – 10 (27)
Диапазон длин волн (число значений λ)	476 – 588 нм (36)
$\lambda_{max}(E_{max} \cdot 10^{-3})$ ионов R^{2-}	557 (100.1) ^в
$\lambda_{max}(E_{max} \cdot 10^{-3})$ ионов HR^-	559 (93.5)
$\lambda_{max}(E_{max} \cdot 10^{-3})$ молекул H_2R	≈ 500 (1.3)
pK_{a1}^a	4.55 ± 0.01
pK_{a2}^a	6.80 ± 0.11

^a Буферы: ацетатные, фосфатные, боратные, или растворы HCl. ^б При $pH < 1.3$ ионная сила > 0.05 М. ^в В водном растворе: 548 нм.

Поведению гидроксиксантонов в мицеллярных растворах ПАВ посвящен ряд работ различных авторов. Сдвиг положения таутомерного равновесия нейтральных форм флуоресцеина и

дихлорфлуоресцеина в сторону лактона в водном растворе при введении ПАВ был отмечен еще в 1958 году [119,463] и подтвержден в дальнейшем как для этих, так и для других флуоресцеиновых красителей [25,159,203,464]. Характер связывания ионных форм мицеллами различных ПАВ [25,40,41-48,60-63,78-87,192,203,463-465] согласуется с нашими данными. Были также определены значения pK_a триоксифенилфлуоронов в растворах катионных ПАВ [466].

Гидроксиксантеновые красители использованы нами в качестве инструмента для исследования мицелл и капель микроэмульсий [259,448,449,455,461], а также растворов водорастворимых полимеров [467]. При использовании с подобной целью данных соединений [8,9,41,79-88,463,468-470], как, впрочем, и других красителей, необходимо учитывать особенности влияния микроокружения на их протолитические и спектрально-люминесцентные свойства в организованных растворах.

Взаимодействия гидроксиксантеновых красителей с ПАВ при концентрации последних ниже ККМ гомомицелл приводит к образованию малорастворимых в воде ионных ассоциатов и смешанных мицелл (краситель + ПАВ); эти явления были нами подробно рассмотрены в другом месте [320]. Анионы флуоресцеиновых красителей образуют с катионными ПАВ и с подобными им веществами ассоциаты, которые экстрагируются из водной фазы хлороформом или другими ограниченно смешивающимися с водой растворителями [471]. С другой стороны, в присутствии неионного ПАВ становится возможным безэкстракционное определение некоторых металлов, например, серебра в виде тройных комплексов Ag^+ – фенантролин – эозин [472]. Применение ПАВ в тонкослойной хроматографии позволяет получить новую информацию о свойствах флуоресцеиновых красителей [473].

Недавно нами было обнаружено, что использование мицелл цвиттерионного ПАВ цетилдиметиламмонийпропансульфоната позволяет осуществить холинэстеразный гидролиз гидрофобных флуорогенных субстратов – диацетилфлуоресцеина и дибутирилфлуоресцеина; возможно, в этом случае можно говорить о мицеллярно-ферментативном катализе [474-477].

Что касается других видов организованных растворов, то известно, что взаимодействие флуоресцеина с циклодекстринами и сахарами приводит к сдвигу таутомерного равновесия нейтральной формы в сторону лактона [190] и к связыванию дианионов R^{2-} флуоресцеина и его галогенпроизводных [191,478].

* * *

В настоящее время в нашей лаборатории в дополнение к уже исследованным упомянутым системам совместно с Н. А. Водолазкой, Н. В. Саламановой, О. Н. Безкровной, А. Г. Якубовской, Л. Н. Вилковой и Е. Ю. Брылевой проводятся исследования спектральных свойств и протолитических равновесий как вышеописанных, так и некоторых новых флуоресцеиновых красителей в прямых микроэмульсиях на основе катионных, неионных и анионного ПАВ, в мицеллах ПАВ различных типов, в обращенных микроэмульсиях на основе анионного ПАВ Аэрозоля ОТ, в пленках Лэнгмюра–Блоджетт, в водных растворах циклодекстринов а также в суспензиях наночастиц SiO_2 в присутствии катионных ПАВ. Некоторые результаты в настоящее время уже готовятся к печати.

Заключение

Представленный в обзоре фактический материал и его обсуждение позволяют оценить общую ситуацию в области исследования спектральных и кислотно-основных свойств флуоресцеиновых красителей, сделать ряд конкретных выводов и высказать соображения о целесообразности дальнейшего изучения тех или иных сторон данной большой проблемы.

1. Можно считать, что протолитические равновесия флуоресцеина в воде исследованы достаточно полно. Найденный нами набор значений микроконстант диссоциации и констант таутомерных равновесий обеспечивает адекватное описание спектральных эффектов и находит подтверждение в работах других авторов. Большой массив значений pK_a флуоресцеина в водно-органических и безводных растворителях различной природы удастся интерпретировать при помощи самосогласованной детальной схемы равновесий, причем даже такие необычные эф-

факты, как инверсия констант диссоциации по первой и второй ступеням ($pK_{a1} > pK_{a2}$), находят достаточно строгое объяснение.

2. Объяснено, почему цвиттерионный таутомер (II) нейтральной формы H_2R флуоресцеина, бесспорно существующий в водном растворе, практически исчезает при добавлении первых порций органических растворителей. В то же время, до сих пор ни в одном растворителе не удается обнаружить моноанион HR^- флуоресцеина, который был бы диссоциирован по гидроксигруппе и содержал недиссоциированную группу $COOH$ (таутомер VI), и везде доминирует таутомер V, содержащий группы OH и COO^- . Квантово-химическое исследование «заселенности» различных таутомеров в растворах, проводимое без учета специфической сольватации, может, по всей видимости, приводить к недооценке долей таутомеров II и V.

3. Таутомер VI моноаниона HR^- всегда доминирует в случае эозина и других 2,4,5,7-тетрагалогенпроизводных флуоресцеина, протолитические равновесия которых в водно-органических и безводных средах также удается адекватно описать при помощи вышеупомянутой детальной схемы равновесий. Исследования в водных растворах в значительной мере лимитируются малой растворимостью нейтральных форм красителей. Табулирован набор значений pK_a во многих чистых и смешанных растворителях, что позволяет прогнозировать характер кислотно-основных равновесий флуоресцеиновых красителей и родственных им соединений в различных средах.

4. Уравнения зависимости констант таутомерного равновесия между окрашенным хиноидным (III) и бесцветным лактонным (IV) таутомерами нейтральных форм H_2R флуоресцеина и эозина от параметра полярности растворителя позволяют предсказать положение таутомерных равновесий в растворителях различной природы.

5. Проведенное нами впервые исследование протолитических равновесий нитропроизводных флуоресцеина позволило выявить принципиально новое явление: не только нейтральные формы H_2R , но и моноанионы HR^- и дианионы R^{2-} могут существовать в виде лактонов, и прежняя детальная схема равновесий должна быть пополнена этими новыми частицами. Особенно заметно склонность к образованию дианиона-лактона проявляется в случае 2,4,5,7-тетранитрофлуоресцеина, причем в этом случае таутомер имеет не бесцветную, а желтую окраску, по причине «нитрофенольного» поглощения.

6. Применение ИК спектроскопии к исследованию равновесий красителей в растворах в общем подтверждает приведенные выше выводы, сделанные на основании электронной спектроскопии, несмотря на то, что использованные в первом случае рабочие концентрации красителей на три порядка более высокие, чем во втором. Наиболее подходящим растворителем оказался диметилсульфоксид. Вместе с тем, круг исследованных объектов здесь может быть расширен. То же относится и к ИК спектрам в твердом состоянии, так как в этом случае наиболее детальные исследования проведены для флуоресцеина; представляют интерес аналогичные исследования для тиофлуоресцеина, флуоресцеин-изотиоцианата и других соединений.

7. Менее исследованными, чем флуоресцеин и его галогенпроизводные, либо практически неисследованными остаются такие красители, как сукцинилфлуоресцеин, нафтофлуоресцеин и их производные, красители, равновесия которых бесспорно осложнены наличием одной или нескольких дополнительных функциональных групп (например, изомеры аминфлуоресцеина, галлеин и другие), «гибриды» флуоресцеина и родаминов — родолы, а также красители, бесцветные нейтральные формы которых представляют собой не лактоны, а лактамы. Тиофлуоресцеины и нитропроизводные флуоресцеина исследованы только лишь в ограниченном круге растворителей, главным образом в 50 %-ном водном этаноле. Хотя равновесия 2,7- и 4,5-дигалогенпроизводных флуоресцеина исследованы нами уже неоднократно, все же для этих соединений предстоит еще подробнее изучить закономерности, влияющие на положение таутомерного равновесия моноаниона HR^- ($V \rightleftharpoons VI$), в том числе в экстракционных системах.

8. Особый интерес представляет проблема протолитических равновесий в возбужденном состоянии и трактовка зависимости спектров флуоресценции и квантового выхода флуоресценции от pH в водных растворах. Даже для базового соединения — флуоресцеина — нет окончательной точки зрения по этому вопросу. Между тем, в органических растворителях и тем более в мицеллярных и других коллоидных системах ситуация может быть еще менее определенной,

а именно такие системы могут служить моделями, пусть усеченными, для интерпретации поведения флуоресцентных индикаторов pH в биологических объектах.

9. Редокс-реакции флуоресцеиновых красителей в неводных средах должны быть исследованы шире, особенно для возможного сопоставления с фотохимическими реакциями.

10. Несмотря на то, что имеются данные о «кажущихся» константах диссоциации некоторых флуоресцеиновых соединений в мицеллярных растворах отдельных типов ПАВ, организованные растворы различных типов образуют широчайшее поле деятельности для исследования этих красителей, так как предстоит еще систематически изучить кислотно-основные и таутомерные равновесия в прямых и обращенных микроэмульсиях, суспензиях фосфолипидов, в лиофобных золях, в пленках Лэнгмюра–Блоджетт, а также в водных и неводных растворах циклодекстринов, каликсаренов и дендримеров.

Автор пользуется случаем выразить признательность всем своим сотрудникам, аспирантам и дипломникам, принимавшим участие в исследованиях флуоресцеиновых красителей, а также всем соавторам статей, опубликованных им по проблеме гидроксиксантеновых и родственных им красителей. Особая благодарность выражается кандидату физ-мат. наук Т. А. Шахвердову за многолетний обмен информацией и обсуждение данных о спектральных свойствах и состоянии ксантеновых красителей в растворах.

Литература

1. Bayer A. Chem. Ber. 1871. Bd. 4. S. 555.
2. Константинова-Шлезингер М. А. Люминесцентный анализ. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1948. 287 с.
3. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей. Л.: Наука, 1967. 616 с.
4. Шефер Ф.П. Лазеры на красителях. М.: Мир, 1976. 330 с.
5. Индикаторы. Т.2. Э. Бишоп (ред.) М.: Мир, 1976. 446 с.
6. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. М.: Химия, 1984. 336 с.
7. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей. М.: Химия, 1984. 592 с.
8. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
9. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 277 с.
10. Neckers D.C., Valdes-Aguilera O.M. Adv. in Photochem. 1993. V.18. P. 315-394.
11. Кантарджян Л.Т. Изв. АН СССР. Сер. физ. 1959. Т. 23. № 1. С. 131-134.
12. Адамов В.С., Кантарджян Л.Т. Опт. и спектр. 1961. Т. 11. № 3. С. 419-422.
13. Lindqvist L. Arkiv Kemi. 1960. Bd. 16. No. 8. S. 79-138.
14. Rozwadowski M. Acta Physica Polonica. 1961. V. 20. Facs. 12. P. 1005-1017.
15. Martin M.M., Lindqvist L. J. Luminescence. 1975. V. 10. P. 381-390.
16. Martin M.M. Chem. Phys. Lett. 1975. V. 35. No. 1. P. 105-111.
17. Guyot G., Arnaud R., Lemaire J. J. Chim. Phys. et Phys- Chim. Biol. 1975. V. 72. N 5. P. 647-653.
18. Нурмухаметов Р. Н., Кунавин Н. И., Хачатурова Г. Т. Изв. АН СССР. Сер. физ. 1978. Т.42. № 3. С. 517-523.
19. Маслов В.Г., Тураева З.Н., Шахвердов Т.А. Журн. аналит. химии. 1981. Т. 36. № 11. С. 2171-2175.
20. Маслов В.Г., Тураева З.Н., Шахвердов Т.А. Журн. аналит. химии. 1986. Т. 41. № 4. С. 622-628.
21. Hiraki K., Nishikawa Y. Bunseki Kagaku. 1981. V. 30. No. 1. P. 45-50.
22. Wolfbeis O.S., Furlinger E., Kroneis H., Marsoner H. Fresenius Z. Anal. Chem. 1983. Bd. 314. S. 119-124.
23. Compton R.G., Coles B.A., Pillkington M.B.G. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1988. V. 84. No. 12. P. 4347-4357.
24. Кецле Г.А., Пономарев С. Г., Стряпков А. В. Журн. аналит. химии. 1994. Т. 49. № 11. С. 1215-1219.

25. Biswas S., Bhattacharya S.Ch., Sen P.K., Moulik S.P. J. Photochem. Photobiol. A.: Chemistry. 1999. V. 123. P. 121-128.
26. Magde D., Rojas G. E., Seybold P. G. Photochem. Photobiol. 1999. V. 70. No. 5. P. 737-743.
27. Boguta A., Wrobel D. J. Fluorescence. 2001. V. 11. No. 2. P. 129-137.
28. Alvarez-Rez J.M., Ballesteros L., Talavera E., Yguerabide J. J. Phys. Chem. A. 2001. V. 105. No 26. P. 6320-6332.
29. Smith S.A., Pretorius W.A. Water SA. 2002. V. 28. No. 4. P. 403-406.
30. Kubista M., Ismail I.H., Forootan A., Sjoegreen B. J. Fluoresc. 2004. V. 14. No. 2. P. 139-144.
31. Kölbel H. Z. Naturforsch. B. 3b. 1948. H. 11/12. S. 442-453.
32. Scheibe G., Brück D. Z. f. Elektrochem. 1950. Bd. 54. No. 6. S. 403-412.
33. Conn H.J. Biological stains. Williams and Wilkins Company: Baltimore, 1961. 355 p.
34. Leonhardt H., Gordon L., Livingston R. J. Phys. Chem. 1971. V. 75. No. 2. P. 245-249.
35. Cramer L.E., Spears K.G. J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. No. 1. P. 221-227.
36. Ермолаев В.Л., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А. Усп. химии. 1976. Т. 45. No. 10. С. 1753-1781.
37. Шахвердов Т.А., Тураева З.Н. Изв. АН СССР. Сер. физ. 1975. Т. 39. № 9. С. 1952-1958.
38. Шахвердов Т.А., Тураева З.Н., Низамов Н. Опт.и спектр. 1979.Т. 47. № 4. С. 803-805.
39. Шахвердов Т.А. В кн. Возбужденные молекулы: кинетика превращений. Л.: Наука, 1982. С. 75-88.
40. Пилипенко А.Т., Волкова А.И., Пшинко Г.Н. Журн.аналит.химии. 1981. Т. 36. № 11. С. 2097-2105.
41. Reed W., Politi M.J., Fendler J.H. J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. No. 15. P. 4591-4593.
42. Rodgers M.A.J. Chem. Phys. Lett. 1981. V. 78. No. 3. P. 509-514.
43. Rodgers M.A.J. J. Phys. Chem. 1981. V. 85. No. 23. P. 3372-3374.
44. Lee P.C., Rodgers M.A.J. J. Phys. Chem. 1983. V. 87. No. 24. P. 4894-4898.
45. Jones G.R., Cundall R.B., Murray D., Duddell D.A. J. Chem. Soc., Faraday Trans. II. 1984. V. 80. No. 10. P. 1201-1213.
46. Mills A., Lawrence C., Douglas P. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2. 1986. V. 82. No. 12. P. 2291-2303.
47. Blatt E. J. Phys. Chem. 1986. V. 90. No. 5. P. 874-877.
48. Kapoor R.C. J. Indian Chem. Soc. 1986. V. 63. No. 6. P. 541-546.
49. Lamberts J.J.M., Neckers D.C. J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. No. 10. P. 7465-7467.
50. Lamberts J.J.M., Schumacher D.R., Neckers D.C. J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. No. 20. P. 5879-5883.
51. Lamberts J.J.M., Neckers D.C. Z. Naturforsch. B. 1984. Bd. 39B. S. 474-484.
52. Chesneau E., Neckers D.C. J. Photochem. Photobiol. A.: Chemistry. 1988. V. 42. No. 2-3. P. 269-281.
53. Neckers D.C., Paczkowski J. Tetrahedron. 1986. V. 42. No. 17. P. 4671-4683.
54. Xu D., Neckers D.C. J. Photochem. Photobiol. A.: Chemistry. 1987. V. 40. No. 2-3. P. 361-370.
55. Valdes-Aguilera O., Neckers D.C. Acc. Chem. Res. 1989. V. 22. No. 5. P. 171-177.
56. Seret A., Gandin E., Van de Vorst A. Chem. Phys. Lett. 1987. V. 135. No. 4,5. P. 427-431.
57. Seret A., Van de Vorst A. J. Phys. Chem. 1990. V. 94. No. 13. P. 5293-5299.
58. Hoebeke M., Gandin E., Decuyper J., Van de Vorst. J. Photochem. 1986. V. 35. No. 2. P. 245-250.
59. Ельцов А.В., Смирнова Н.П., Поняев А.И., Захаренко В.С., Ярцев А.И. Журн. общей химии. 1989. Т. 59. Вып. 11. С. 2587-2600.
60. Bilski P., Dabestani R., Chignell C.F. J. Phys. Chem. 1991. V. 95. No. 15. P. 5784-5791.
61. Bilski P., Chignell C.F. J. Photochem. Photobiol. A.: Chemistry. 1994. V. 77. P. 49-58.
62. Bilski P., Dabestani R., Chignell C.F. J. Photochem. Photobiol. A : Chem. 1994. V. 79. P. 121-130.
63. Bilski P., Holt R.N., Chignell C.F. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 1997. V. 110. P. 67-74.
64. Stomphorst R.G., van der Zwang G., van Zandvoort M.A.M.J., Sieval A.B., Zuillhof H., Vergeldt F.J., Schaafsma T.J. J. Phys. Chem. A. 2001. V. 105. No. 17. P. 4235-4240.
65. Vogel E. Ann. Phys. u. Chem. 1891. Bd. 43. H. 7. S. 449-472.
66. Moir J. Trans. Royal Soc. South Africa. 1922. V. 10 [3]. No. 1-4. P. 159-164.

67. Кравец Т.П. Изв. Императорского Московского инж. училища. 1912. Ч. II. Вып. VI.
68. Kurucsev T. J. Chem. Educ. 1978. V. 55. No. 2. P. 128-129.
69. Kurucsev T. J. Chem. Soc., Faraday Trans. II. 1986. V. 82. No. 1. P. 15-26.
70. Fajans K., Wolff H. Z. anorg. allg. Chem. 1924. Bd. 137. H. 3/4. S. 221-245.
71. Kolthoff I. M. Chem. Rev. 1935. V. 16. P. 87-98.
72. Кольтгоф И. М., Сендэл Е. Б. Количественный анализ. М., 1938. 712 с.
73. Pungor E., Konkoly Thege I. Talanta. 1963. V. 10. P. 1211-1215.
74. Петров С.М. Свойства цветных и флуоресцентных индикаторов в неводных растворах: автореф...канд.хим.наук. Харьков, 1952. 14 с.
75. Sheppard S.E., Lambert R.H., Walker R.D. J. Chem. Phys. 1943. V. 11. No. 6. P. 263-275.
76. Corrin M.L., Harkins W.D. J. Am. Chem. Soc. 1947. V. 69. No. 3. P. 679-683.
77. Corrin M.L., Harkins W.D. J. Am. Chem. Soc. 1947. V. 69. No. 3. P. 683-688.
78. Zutrauen H.A. J. Chim. Phys. 1956. V. 53. P. 62-76.
79. Nakagawa T. Ann. Rept. Shionogi Research Lab. 1958. V. 8. P. 886-899.
80. Ledbetter J.W., Bowen J.R. Anal. Chem. 1969. V. 41. No. 10. P. 1345-1347.
81. Ledbetter J.W., Bowen J.R. Anal. Chem. 1971. V. 43. No. 6. P. 773-774.
82. Kapoor R.C., Chand P., Aggarwala V.P. Anal. Chem. 1972. V. 44. No. 12. P. 2107-2109.
83. Kapoor R.C., Jain M.K., Mishra V.N. J. Luminescence. 1981. V. 22. No. 4. P. 429-439.
84. Kulic J., Vitacek T. Vys. Sk. Chemick. Pardubice. Sci. Pap. 1986. V. 49. P. 369-379.
85. Qi W., Li W., Wei X. J. of Hangzhou University. 1986. V. 13. No. 4. P. 461-470.
86. Ortmann W., Fanghänel E. Z. Chem. 1988. Bd. 28. H. 6. S. 221.
87. Hadjianestis J., Nikokavouras J. J. Photochem. Photobiol. A.: Chemistry. 1993. V. 69. P. 337-343.
88. Birkedal-Hansen H. Histochemie. 1973. V. 36. P. 73-87.
89. Thelen M., Petrone G., O'Shea P.S., Azzia A. Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 766. P. 161-168.
90. Thelen M., O'Shea P.S., Petrone G., Azzia A. J. Biol. Chem. 1985. V. 260. No. 6. P. 3626-3631.
91. Sjöback R., Nygren J., Kubista M. Biopolymers. 1998. V. 46. P. 445-453.
92. Huntington J.A., McCoy A., Belzar K.J., Pei X.Y., Gettins P.G.W., Carrell R.W. J. Biol. Chem. 2000. V. 275. No. 20. P. 15377-15383.
93. Yan Y., Myrick M.L. Analyt. Chim. Acta 2001. V. 441. P. 87-93.
94. Yakovleva J., Davidsson R., Lobanova A., Bentsson M., Eremin S., Laurell T., Emneus J. Anal. Chem. 2002. V. 74. No. 13. P. 2994-3004.
95. Croce A.C., Supino R., Lanza K.S., Locatelli D., Baglioni P., Bottiroli G. Photochem. Photobiol. Sci. 2002. V. 1. P. 71-78.
96. Kubica K., Langner M., Gabrielska J. Cellular & Molecular Biology Lett. 2003. V. 8. P. 943-954.
97. Klonis N., Sawyer W. H. Photochem. Photobiol. 2003. V. 77. No. 5. P. 502-509.
98. Caturla F., Enjo J., Bernabeu M. C., Le Serre S. Tetrahedron. 2004. V. 60. P. 1903-1911.
99. Wicks D.A., Li P.C.H. Anal. Chim. Acta. 2004. V. 507. P. 107-114.
100. Li X., Ma H., Dong S., Duan X., Liang S. Talanta. 2004. V. 62. P. 367-371.
101. Aoki M., Iwayama Y. J. Pharm. Soc. Jap. 1959. V. 79. No. 4. P. 522-526.
102. Bailey R.W., Dagnall R.M., West T.S. Talanta. 1966. V.13. No. 12. P. 1661-1665.
103. Лисицына Д.Н., Щербов Д.П. Журн.аналит.химии. 1970. Т. 25. № 12. С. 2310-2313.
104. Шкробот Э.П., Лукашенко Н.В., Толмачева Н.С., Родман Г.И. В сб. Анализ руд цветных металлов и продуктов их переработки. Научные труды ГИНЦВЕТМЕТа. № 34. М.: Металлургия, 1971. С.22-32.
105. Тананайко М.М., Биленко Н.С. Журн.аналит.химии. 1977. Т.32. № 2. С. 336-338.
106. Столяров К.П., Фирюлина В.В. Журн.аналит.химии. 1978. Т. 33. № 11. С.2102-2107.
107. Тананайко М.М., Биленко Н.С. Журн.аналит.химии. 1979. Т. 34. № 10. С. 1899-1902.
108. Матвеев М.А., Ахметова С.Д., Щербов Д.П. Журн.аналит.химии. 1980. Т. 35. № 8. С. 1640-1644.
109. Sanz-Medel A., Blanco Gomis D., Garcia Alvarez J.R. Talanta. 1981. V. 28. No. 7A. P. 425-430.
110. Sanz-Medel A., Blanco Gomis D., Fuente Alonso E. Talanta. 1984. V. 31. No. 7. P. 515-519.

111. Blanco Gomis D., Fuente Alonso E., Andres Garcia E., Arias Abrodo P. *Talanta*. 1989. V. 36. No. 12. P. 1237-1241.
112. El-Enany N. *Il Farmaco*. 2004. V. 59. P. 63-69.
113. Holmes W.C. *J. Amer. Chem. Soc.* 1924. V. 46. P. 2770-2775.
114. Holmes W.C., Scanlan J.T. *J. Amer. Chem. Soc.* 1927. V. 49. No. 6. P. 1594-1598.
115. Orndorff W.R., Gibbs R.C., Shapiro C.V. *J. Amer. Chem. Soc.* 1928. V. 50. No. 3. P. 819-828.
116. Gibbs R.C., Shapiro C.V. *J. Amer. Chem. Soc.* 1929. V. 51. P. 1769-1773.
117. Ramart-Lucas P. *Compt. rend.* 1937. V. 205. P. 1409-1411.
118. Nagase Y., Ohno T., Goto T. *J. Pharm. Soc. Jap.* 1953. V. 73. P. 1039-1043.
119. Nash T. *J. Phys. Chem.* 1958. V. 62. No. 12. P. 1574-1578.
120. Zanker V., Peter W. *Ber.* 1958. Bd. 91. No. 3. S. 572-580.
121. Gutsze A., Walerys H. *Bull. de l'academic Polon. des Sci. Ser. des Scien. math. astr. et phys.* 1961. V. 9. No. 6. P. 507-513.
122. Gutsze A., Walerys H. *Bull. de l'academic Polon. des Sci. Ser. des Scien. math. astr. et phys.* 1961. V. 9. No. 11. P. 839-843.
123. Grzywacz J., Smagowski H. *Z. Naturforschg.* 1965. Bd. 20a. S. 1358-1363.
124. Pant H.C. *Indian J. Pure and Appl. Phys.* 1968. V. 6. No. 1. P. 19-24.
125. Guhaniyogi S.C., Mandal B.M., Palit S.R. *Indian J. Chem.* 1975. V. 13. P. 560-563.
126. Chen S.C., Nakamura H., Tamura Z. *Chem. Pharm. Bull.* 1979. V. 27. No. 2. P. 475-479.
127. Martin E., Pardo A., Guijarro M.S., Fernandez-Alonso J.I. *J. Mol. Structure.* 1986. V. 142. P. 197-200.
128. Tribalat S., Piolet C. *Bull. Soc. Chim. France.* 1961. No. 8,9. P. 1527-1530.
129. Oster G., Oster G.K., Karg G. *J. Phys. Chem.* 1962. V. 66. No. 12. P. 2514-2517.
130. Zwicker E.F., Grossweiner L.I. *J. Phys. Chem.* 1963. V. 67. No. 3. P. 549-555.
131. Issa R.M., Abdel-Halim F.M., Hasanein A.A. *Electrochim. Acta.* 1969. V. 14. No. 7. P. 561-567.
132. Abdel-Halim F.M., Issa R.M., El-Ezaby M.S., Hasanein A.A. *Z. phys. Chem. N. F.* 1970. Bd. 73. S. 59-67.
133. Issa I.M., Issa R.M., Ghoneim M.M. *Z. phys. Chem.* 1972. Bd. 250. H. 3/4. S. 161-167.
134. Issa R.M., Ghoneim M.M., Idriss K.A., Harfoush A.A. *Z. phys. Chem. N. F.* 1975. Bd. 94. S. 135-146.
135. Столяров К.П., Фирюлина В.В. *Журн.аналит.химии.* 1971. Т. 26. № 9. С. 1731-1735.
136. Bannerjee N.R., Vig S.K. *Indian J. Chem.* 1971. V. 9. No. 5. P. 444-448.
137. Negi A.S., Bannerjee N.R., Vijay Sarda. *Indian J. Chem.* 1975. V. 13. P. 274-276.
138. Shibata M., Nakamizo M., Kakiyama H. *Nippon Kagaku Kaishi.* 1972. No. 4. P. 681-686.
139. Wyatt P.A., Zochowski Z.M. *Z. phys. Chem. N. F.* 1976. Bd. 101. S. 143-150.
140. Пинкас М.А., Тутунару М.Н., Ропот В.М. *Журн.аналит.химии.* 1977. Т. 32. № 9. С. 1807-1811.
141. Пинкас М.А., Ропот В.М., Тутунару М.Н. *Изв. АН Молд. ССР. Сер. хим.* 1979. № 4. С. 59-63.
142. Матвеев М.А., Щербов Д.П., Ахметова С.Д. В сб. *Исследования в области химических и физических методов анализа минерального сырья.* Вып. 6. Алма-Ата: ОНТИ КазИМС, 1977. С. 28-39.
143. Матвеев М.А., Щербов Д.П., Ахметова С.Д. *Журн.аналит.химии.* 1979. Т. 34. № 6. С. 1046-1054.
144. Dubost J.P., Colleter J.C., Audry E., Dallet P. *Bull. Soc. Chim. France.* 1979. No. 9,10. P. 398-400.
145. Fompeydie D., Onur F., Levillain P. *Bull. Soc. Chim. France.* 1979. Part 1. No. 9-10. P. 375-380.
146. Fompeydie D., Levillain P. *Bull. Soc. Chim. France.* 1980. No. 11-12. P. 459-465.
147. Idriss K.A., Awad A.M., Seleim M.M., Abu-Bakr M.S. *Indian J. Chem.* 1981. V. 20 A. No. 5. P. 488-491.
148. Привалова Н.Ю., Фофонова Р.М. *Журн. физ. химии.* 1982. Т. 56. № 12. С. 3023-3025.
149. Lenquel J., Vecernik J., Krtil J. *Radiochem. Radioanal. Lett.* 1982. V. 54. No. 2. P. 111-118.
150. Mudakavi J.R. *Analyst.* 1984. V. 109. No. 12. P. 1577-1579.
151. Martinez-Izquierdo M.E., Durand-Alegria J.S., Cabrera- Martin A., Gallego-Andreu. *Analyst.* 1984. V. 109. No. 3. P. 377-379.

152. Levillain P., Fompeydie D. *Anal. Chem.* 1985. V. 57. No. 13. P. 2561-2563.
153. Diehl H., Markuszewski R. *Talanta*. 1985. V. 32. No. 2. P. 159-165.
154. Diehl H., Horchak-Morris N., Hefley A.J., Munson L.F., Markuszewski R. *Talanta*. 1986. V.33. No. 11. P. 901-905.
155. Diehl H., Horchak-Morris N. *Talanta*. 1987. V. 34. No. 8. P. 739-741.
156. Diehl H. *Talanta*. 1989. V. 36. No. 3. P. 413-415.
157. Diehl H. *Talanta*. 1989. V. 36. P. 416-418.
158. Diehl H. *Talanta*. 1989. V. 36. P. 799-802.
159. Kibblewhite J., Drummond C.J., Grieser F., Thistlethwaite P.J. *J. Phys. Chem.* 1989. V. 93. No. 21. P. 7464-7473.
160. Amat-Guerri F., Martin M.E., Sauz J., Martinez-Utrilla R. *Talanta*. 1989. V. 36. No. 6. P. 704-707.
161. Amat-Guerri F., Lopez-Gonzalez M.M.C., Sastre R., Martinez-Utrilla R. *Dyes and Pigments*. 1990. V. 13. P. 219-232.
162. Bardes E., Larrey B., Zhu X.X., Valeur B. *Chem. Phys. Lett.* 1990. V. 171. No. 4. P. 362-368.
163. Фролов В.Ю., Бабашов М.А., Кудрявцев С.Г., Журн. физ. химии. 1992. Т. 66. № 11. С. 2970-2974.
164. Фролов В.Ю., Бабашов М.А., Кудрявцев С.Г., Журн. физ. химии. 1992. Т. 66. № 11. С. 2975-2980.
165. Compton R.G., Winkler J., Riley D.J., Beaarpark S.D. *J. Phys. Chem.* 1994. V. 98. No. 27. P. 6818-6826.
166. Yguerabide J., Talavera E., Alvarez J.M., Quintero B. *Photochem. Photobiol.* 1994. V. 60. No. 5. P. 435-441.
167. Tamura Z., Morioka T., Maeda M., Tsuji A. *Bunseki Kagaku*. 1994. V. 43. P. 339-346.
168. Sjöback R., Nygren J., Kubista M. *Spectrochim. Acta. A*. 1995. V. 51. P.7-21.
169. Klonis N., Sawyer W.H. *J. Fluorescence*. 1996. V. 6. No. 3. P. 147-157.
170. Klonis N., Sawyer W.H. *Photochem. Photobiol.* 2000. V. 72. No. 2. P. 179-185
171. Smith S.A., Pretorius W.A. *Water SA*. 2002. V. 28. No. 4. P. 395-402.
172. Saari L.A., Seitz W.R. *Anal. Chem.* 1982. V. 54. No. 4. P. 821-823.
173. Seitz W.R. *Anal. Chem.* 1984. V. 56. No. 1. P. 16A-33A.
174. Fuh M.R.S., Burgess L.W., Hirschfeld T., Christian G.D., Wang F. *Analyst*. 1987. V. 112. No. 8. P. 1159-1163.
175. Choi M.F., Hawkins P. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1995. V. 91. No. 5. P. 881-885.
176. Choi M.F., Hawkins P. *Anal. Chem.* 1995. V. 67. No. 21. P. 3897-3902.
177. Choi M.F., Hawkins P. *Talanta*. 1995. V. 42. No. 3. P. 483-492.
178. Choi M.F., Hawkins P. *Anal. Chim. Acta*. 1997. V. 344. P. 105-110.
179. Choi M.F., Hawkins P. *Sensors and Actuators. B*. 1997. V. 38-39. P. 390-394.
180. Choi M. M. F. *J. Photochem. Photobiol. A. Chemistry*. 1998. V. 114. P. 235-239.
181. Prats M., Tocanne J.-F., Teissie J. *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 149. P. 663-668.
182. Prats M., Tocanne J.-F., Teissie J. *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 162. P. 379-385.
183. Tamburella-Luca A.A., Hébert Ph., Antonie R., Brevet P.F., Girault H.H. *Langmuir*. 1997. V. 13. No. 16. P. 4428-4434.
184. Алексеева В.И., Ибраев Н.Х., Лукьянец Е.А., Маринина Л.Е., Саввина Л.П., Сатыбалдина Д.Ж. Журн. физ. химии. 1999. Т. 73. № 12. С. 2217-2222.
185. Ибраев Н.Х., Жунусбеков А.М. *Оптика и спектроскопия*. 2002. Т. 92. № 2. С. 207-210.
186. Tsukanova V., Harata A., Ogawa T. *Langmuir*. 2000. V. 16. No. 3. P. 1167-1171.
187. Tsukanova V., Harata A., Ogawa T. *J. Phys. Chem. B*. 2000. V. 104. No. 32. P. 7707-7712.
188. Li J.J., Fang X., Tan W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 292. No. 1. P. 31-40.
189. Yuan D.Q., Koga K., Kourogi Y., Fujita K. *Tetrahedron Lett.* 2001. V. 42. P. 6727-6729.
190. Buvari A., Barcza L., Kajtar M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 1988. P. 1687-1690.
191. Flamigni L. *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97. No. 38. P. 9566-9572.
192. Flamigni L. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1994. V. 90. No. 16. P. 2331-2336.
193. Marchioni F., Venturi M., Credi A., Balzani V., Belohradsky M., Elizarov A.M., Tseng H.-R., Stoddart J.F. *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. No. 2. P. 568-573.
194. Ortmann W., Wassiljuk I., Fanghaenel E. *J. Prakt. Chem.* 1989. Bd. 331. H. 2. S. 331-341.
195. Ельцов А.В., Поняев А.И., Мартынова В.П. Журн.общей химии. 1990. Т. 60. No. 3. С.708.

196. Ельцов А. В., Мартынова В. П., Петровская О. Г., Смирнова Н. П., Мюллер В. Ф., Хартман Х., Шютц Р. Журн. общей химии. 1991. Т. 61. Вып. 8. С. 1876-1883.
197. Ельцов А. В., Поняев А. И., Мартынова В. П. Журн. общей химии. 1992. Т. 62. Вып. 7. С. 1628-1630.
198. Ельцов А. В., Поняев А. И., Смирнова Н. П., Хартман Х., Шютц Р., Мюллер В. Ф. Журн. общей химии. 1993. Т. 63. Вып. 2. С. 439-447.
199. Elcov A.W., Smirnova N.P., Ponyaev A.I., Martinova W.P., Schütz R., Hartmann H. J. Luminescence. 1990. V. 47. No. 3. P. 99-105.
200. Klimchuk E., Rodgers M.A.G., Neckers D.C. J. Phys. Chem. 1992. V. 96. No. 24. P. 9817-9820.
201. Sun W.-C., Gee K.R., Klaubert D.H., Haugland R.P. J. Org. Chem. 1997. V. 62. No. 19. P. 6469-6475.
202. Choi M.F., Hawkins P. Spectroscopy Letters. 1994. V. 27. P. 1049-1063.
203. Song A. Zhang J., Zhang M., Shen T., Tang J. Colloids Surfaces. A: Physicochem. Eng. Aspect. 2000. V. 167. 253-262.
204. Van Blaaderen A., Vrij A. Langmuir. 1992. V. 8. No. 12. P. 2921-2931.
205. Valivety R.H., Rakels L.L., Blanco R.M., Johnston G.A., Brown L., Suckling C.J., Halling P.J. Biotechnol. Lett. 1990. V. 12. No. 7. P. 475-480.
206. Brown L., Halling P.J., Johnston G.A., Suckling C.J., Valivety R.H. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1990. P. 3349-3353.
207. Halling P.J., Han Y., Johnston G.A., Suckling C.J., Valivety R.H. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1995. P. 911-918.
208. Mi Y., Bakker E. J. Electrochem. Soc. 1997. V. 144. No. 2. P. L27-L28.
209. Tamulis A., Tamuliene J., Balevicius M.L., Rinkevicius Z., Tamulis V. Structural Chem. 2003. V. 14. No. 6. P. 643-648.
210. Wang L., Roitberg A., Meuse C., Gaigalas A.K. Spectrochim. Acta. Part A. 2001. V. 57. P. 1781-1791.
211. Hoffmann T.A. Acta Phys.Hung. 1962. V. 14. P. 177-185.
212. Hirano K. J. Chem. Soc. Jap., Chem. Ind. Chem. 1976. No. 3. P. 361-365.
213. Hirano K. Bull. Chem. Soc. Jap. 1983. V. 56. No. 3. P. 850-854.
214. Shen T. Dyes and Pigments. 1987. V. 8. P. 375-380.
215. Апостолова Е.С., Ельцов А.В. Журн. общей химии. 1990. Т. 60. Вып. 11. С. 2606-2614.
216. Апостолова Е.С., Ельцов А.В. Журн. общей химии. 1991. Т. 61. Вып. 5. С. 1236-1240.
217. Fabian W.M.F., Schuppler S. Wolfbeis O.S. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1996. P. 853-856.
218. Jang Y.H., Hwang S., Chung D.S. Chem. Lett. 2001. P. 1316-1317.
219. Бейтс Р. Определение pH. Л.: Химия, 1972. 400 с.
220. Александров В.В. Кислотность неводных растворов. Харьков: Вища школа, 1981. 152 с.
221. Мчедлов-Петросян Н.О. Деп. ОНИИТЭХим, г. Черкассы, 1174 хп-Д82 от 1.11.82, 38 с.
222. Мчедлов-Петросян Н.О., Миндрин В.Ф., Никишина Л.Е. Известия вузов СССР. Химия и химическая технология. 1985. Т. 28. № 6. С. 29-32.
223. Аветисян М.А., Адамов В.С., Кантарджян Л.Т., Чиркин С.С. Изв. АН СССР. Сер. физ. 1963. Т. 27. № 6. С. 796-798.
224. Lopez Arbeloa I. Thermochim. Acta. 1983. V. 60. P. 219-224.
225. Rohatgi K.K., Mukhopadhyay A.K. J. Indian. Chem. Soc. 1972. V. 49. No. 12. P. 1311-1320.
226. Lopez Arbeloa I. J. Chem. Soc., Faraday. Trans. II. 1981. V. 77. No. 10. P. 1725-1733.
227. Кесслер Ю.М., Зайцев А.Л. Сольвофобные эффекты. Л.: Химия, 1989. 312 с.
228. Holmes W.C. Industr. Eng. Chem. 1924. V. 16. No. 1. P. 35-40.
229. Söderborg. Annalen d. Physik. 1913. Bd. 41. H. 2. S. 381-402.
230. Lukatu E. Commun. Acad. Rep. Popul. Romine. 1956. Т. 6. No. 2. P. 35-42.
231. Рева М.Г., Рыжиков Б.Д., Сенаторова Н.Р. Вестник МГУ. Сер. 3. Физика, астрономия. 1980. Т. 21. № 3. С. 63-67.
232. Мчедлов-Петросян Н.О. Вестник Харьковского университета. 1984. № 260. С. 34-38; Chem. Abstr. 1985 : 102 : 157197.
233. Lewis G.N., Bigeleisen J. J. Amer. Chem. Soc. 1943. V. 65. P. 2107-2110.
234. Lewis G.N. J. Amer. Chem. Soc. 1945. V. 67. P. 770-775.

235. Landolt-Bornstein. I Bd. 3 Teil. Zahlwerte und Funktionen. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer, 1951. 724 S.
236. Biedrzycka D., Bilot Z., Kowski A., Korba M. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys. 1962. V. 10. No. 11. P. 611-616.
237. Rohatgi K.K. J. Indian Chem. Soc. 1965. V. 42. No. 11. P. 737-743.
238. Machwe M.K. Indian J. Pure Appl. Phys. 1975. V. 13. No. 5. P. 337-339.
239. Южаков В.И., Салецкий А.М., Наний Н.В. Журн. физ. химии. 1984. Т. 58. № 4. С. 1024-1026.
240. Мchedlov-Петросян Н.О., Мельник В.В. Доклады АН СССР. 1979. Т. 245. № 4. С. 883-887.
241. Мchedlov-Петросян Н.О., Никишина Л.Е. Вестник ХГУ. 1983. № 242. С. 44-50.
242. Мchedlov-Петросян Н.О., Васецкая Л.В. Журн. общей химии. 1989. Т. 59. Вып. 3. С. 691-703.
243. Мchedlov-Петросян Н.О. Дисс. ... докт. хим. наук. Харьков, 1992. 619 с.
244. Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1986. 200 с.
245. Комарь Н.П., Адамович Л.П., Мельник В.В., Мchedlov-Петросян Н.О. Журн. аналит. химии. 1978. Т. 33. № 4. С. 822-824; Chem. Abstr. 1978 : 89 : 480944.
246. Адамович Л.П., Мельник В.В., Мchedlov-Петросян Н.О. Журн. физич. химии. 1979. Т. 53. № 2. С. 356-359.
247. Мchedlov-Петросян Н.О. Деп. ОНИИТЭХим., г. Черкассы, 2641/79 от 24.04.79.
248. Мchedlov-Петросян Н.О. Журн. аналит. химии. 1979. Т. 34. № 6. С. 1055-1059; Chem. Abstr. 1979 : 91 : 492965.
249. Мchedlov-Петросян Н.О. Дисс. ... канд. хим. наук. Харьков, 1979. 296 с.
250. Мchedlov-Петросян Н.О. Журн. физич. химии. 1980. Т. 54. № 6. С. 1480-1483.
251. Мchedlov-Петросян Н.О., Адамович Л.П., Никишина Л.Е. Журн. аналит. химии 1980. Т. 36. № 8. С. 1495-1502.
252. Мchedlov-Петросян Н.О. Деп. ОНИИТЭХим., г. Черкассы, 943хп - Д81 от 6.11.81, 42 с.; Chem. Abstr. 1983 : 98 : 106445.
253. Мchedlov-Петросян Н.О., Романенко А.В., Никишина Л.Е. Журн. аналит. химии 1984. Т. 39. № 8. С. 1395-1403.
254. Мchedlov-Петросян Н.О., Клещевникова В.Н. Деп. ОНИИТЭХим., г. Черкассы, 424-хп – 89 деп., 41 с.
255. Мchedlov-Петросян Н.О. Деп. ОНИИТЭХим., г. Черкассы, 2641 – 79 деп., 14 с.;
256. Мchedlov-Петросян Н.О., Алексеева В.И., Грецов Ю.В., Кухтик В.И. Журн. общей химии. 1991. Т. 61. Вып. 1. С. 217-225.
257. Mchedlov-Petrossyan N.O., Rubtsov M.I., Lukatskaya L.L. Dyes and Pigments. 1992. V. 18. P. 179-198.
258. Мchedlov-Петросян Н.О., Водолазкая Н.А., Самойлов Д.В.. Вестник Харьковского национального университета. 2000. № 495. Химия. Вып. 6 (29). С. 113-118.
259. Mchedlov-Petrossyan N.O., Vodolazkaya N.A., Timiy A.V., Gluzman E.M., Alekseeva V.I., Savvina L.P. Вестник Харьковского национального ун-та. 2002. № 573. Химия. Вып. 9 (32). С. 171-208; <http://preprint.chemweb.com/physchem/0307002>.
260. Mchedlov-Petrossyan N.O., Isaenko Y.V., Vodolazkaya N.A., Goga S.T. <http://preprint.chemweb.com/physchem/0309005>.
261. Комарь Н.П. Журн. аналит. химии. 1975. Т. 30. № 3. С. 421-442.
262. Мельник В.В., Мchedlov-Петросян Н.О. XIII Всесоюзное Чугаевское совещание по химии комплексных соединений. 1978. Тезисы. Москва. С. 261; Chem. Abstr. 1979 : 90 : 40186.
263. Мchedlov-Петросян Н.О., Савенкова Л.Н., Набока И.А. Деп. ОНИИТЭХим. Черкассы. 242 - хп - Д 81. 26 с.; Chem. Abstr. 1983 : 98 : 16216.
264. Ostwald W. Z. phys. Chem. 1892. Bd. 9. S. 579-602.
265. Бугаевский А.А., Холин Ю.В. Деп. УкрНИИТИ № 1809-Ук 88 от 08.07.88. 80 с.
266. Kalousek I., Jandova D., Vodrazka Z. Int. J. Biol. Macromol. 1980. V. 2. No. 4-6. P. 284-288.
267. Мерный С.А., Коняев Д.С., Холин Ю.В. Вісник Харк. ун-ту. № 420. Хімія. Вип. 2. 1998. С. 112-120; Холин Ю.В. Количественный физико-химический анализ комплексообразования в растворах и на поверхности химически модифицированных кремнеземов: содержательные модели, математические методы и их приложения. Харьков: Фолио, 2000. 288 с.

268. Gandin E., Piette J., Lion Y. J. *Chromatogr.* 1982. V. 249. P. 393-398.
269. Glowacki J. *Bull. de l'academic Polon.des Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys.* 1962. V. 10. No. 2. P. 115-119.
270. Drabent R., Drabent Z., Pyszka J. *Bull. de l'academic Polon.des Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys.* 1964. V. 12. No. 2. P. 113-117.
271. Drabent R., Drabent Z., Pyszka J. *Bull. de l'academic Polon.des Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys.* 1964. V. 12. No. 4. P. 239-243.
272. Drabent R., Drabent Z., Pyszka J. *Bull. de l'academic Polon.des Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys.* 1964. V. 12. No. 7. P. 423-427.
273. Drabent R. J. *Bull. de l'academic Polon.des Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys.* 1966. V. 14. No. 4. P. 229-232.
274. Drabent Z., Pyszka J. *Bull. de l'academic Polon.des Sci. Ser. des. Scien. math. astr. et phys.* 1966. V. 14. No. 6. P. 345-350.
275. Johnson C.D., Katritzky A.R., Shapiro S.A. *J. Amer. Chem. Soc.* 1969. V. 91. No. 24. P. 6654-6662.
276. Meyer R., Fischer O. *Ber.* 1913. Bd. 46. S. 70-84.
277. Мчедлов-Петросян Н.О., Миндрин В.Ф., Никишина Л.Е. *Доклады АН СССР.* 1985. Т. 283. № 3. С. 670-673.
278. Мчедлов-Петросян Н.О., Миндрин В.Ф. *Межвузовский сборник “Сольватационные процессы в растворах”.* Иваново. 1985. С. 65-73.
279. Мчедлов-Петросян Н.О., Миндрин В.Ф. *Журн. физич. химии.* 1986. Т. 60. № 6. С. 1438-1441.
280. Мчедлов-Петросян Н.О., Миндрин В.Ф. *Вестник ХГУ.* 1987. № 300. С. 43-47.
281. Mtschedlov-Petrossian N.O., Arias Kordowa E., Schapowalow S.A., Rappoport I.V., Egorowa S.I. *Z. Chem.* 1990. Bd. 30. H. 12. S. 442-443.
282. Мчедлов-Петросян Н.О., Раппопорт И.А. *Вестник ХГУ.* 1993. № 377. С. 44-47.
283. Мчедлов-Петросян Н.О. *Межвузовский сборник “Теоретические методы описания свойств растворов”.* 1987. Иваново. С. 93-103.
284. Mchedlov-Petrossyan N.O., Kukhtik V.I., Alekseeva V.I. *Dyes and Pigments.* 1994. V. 24. P. 11-35 (1994. V. 26. No. 4).
285. Мчедлов-Петросян Н.О. *Журн. общей химии.* 2003. Т. 73. Вып. 2. С. 288-295.
286. Мчедлов-Петросян Н.О., Салинас Майорга Р., Суков Ю.Н., Рубцов М.И. *Деп. ОНИИТЭ-Хим, г. Черкассы,* 1989, № 812. хп-89.
287. Мчедлов-Петросян Н.О., Салинас Майорга Р., Суков Ю.Н. *Журн. общей химии.* 1991. Т.61. Вып. 1. С.225-233.
288. Мчедлов-Петросян Н.О., Салинас Майорга Р., Рубцов М.И., Черная Т.А. *Межвузовский сборник “Специфика сольватационных процессов в растворах”* Иваново. 1991. С. 46-59.
289. Mchedlov-Petrossyan N.O., Salinas Mayorga R. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1992. V. 88. No. 20. P. 3025-3032.
290. Мчедлов-Петросян Н.О., Черная Т.А., Переверзев А.Ю. *Журн.аналит.химии* 1992. Т. 47. № 4. С. 598-602.
291. Мчедлов-Петросян Н.О. *Журн. физич. химии.* 1985. Т. 59. № 12. С. 3000-3004.
292. Мчедлов-Петросян Н.О., Калембет О.А., Ариас Кордова Э. *Вестник ХГУ.* 1989. № 340. С. 3-18.
293. Мчедлов-Петросян Н.О. *Вестник ХГУ.* 1991. № 359. С. 18-32.
294. Мчедлов-Петросян Н.О., Федоров Л.А., Соколовский С.А., Суков Ю.Н., Салинас Майор-га Р. *Изв. АН. Сер. хим.* 1992. № 3. С. 512-521.
295. Мчедлов-Петросян Н.О. *Укр. хим. журн.* 1987. Т.53. №12. С.1304-1308.
296. Mchedlov-Petrossyan N.O., Kukhtik V.I., Bezugliy V.D. *J. Phys. Org. Chem.* 2003. V. 16. P. 380-397.
297. Jones G.R., Duddell D.A., Murray D., Cundall R.B. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II.* 1984. V. 80. No. 10. P. 1181-1199.
298. Thiel A., Diehl R. *Marb. Sitzungsber.* 1927. Bd. 62. S. 471-546.
299. Kolthoff I.M., Chantooni M.K., Bhowmik S. *Anal. Chem.* 1967. V. 39. No. 3. P. 315-320.
300. Kolthoff I.M., Chantooni M.K., Bhowmik S. *J. Am. Chem. Soc.* 1968. V. 90. No. 1. P. 23-28.
301. Мчедлов-Петросян Н.О. *Журн.аналит.химии* 1986. Т. 41. № 10. С. 1771-1779.

302. Кругляк А.И., Мchedlov-Петросян Н.О., Суров Ю.Н., Иванова Е.Ф. Укр. хим. журн. 1986. Т. 52. № 11. С. 1192-1197.
303. Zhao Z.G., Shen T., Xu H.J. Spectrochim. Acta. 1989. V. 45 A. No. 11. P. 1113-1116.
304. Лузанов А. В., Иванов В. В. Укр. физич. журн. 1997. Т. 42. № 10. С. 1187-1195.
305. Альберт А., Сергент Е. Константы ионизации кислот и оснований. М.: Химия, 1964. 180 с.
306. Белл Р. Протон в химии. М.: Мир, 1977. 384 с.
307. Верещагин А.Н. Индуктивный эффект. М.: Наука, 1987. 325 с.
308. Hinckley D.A., Seybold P.G., Borris D.P. Spectrochim. Acta. 1986. V. 42 A. No. 6. P. 747-754.
309. Kolthoff I.M., Bhowmik S., Chantooni M.K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1966. V. 56. P. 1370-1376.
310. Мchedlov-Петросян Н.О., Васецкая Л.В., Коваль Е.В., Любченко И.Н. Доклады АН СССР. 1985. Т. 284. № 2. С. 394-398.
311. Mchedlov-Petrosyan N.O., Tychina O.N., Berezhnaya T.A., Alekseeva V.I., Savvina L.P. Dyes and Pigments. 1999. V. 43. P. 33-46.
312. Самойлов Д.В., Мchedlov-Петросян Н.О., Мартынова В.П., Ельцов А.В. Журн. общей химии. 2000. Т. 70. Вып. 8. С. 1343-1357.
313. El'tsov A.V., Samoylov D.V., Mchedlov-Petrosyan N.O. Вестник Харьковского национального университета. 2000. № 477. Химия. Вып. 5 (28). С. 75-87.
314. Мchedlov-Петросян Н.О., Водолазкая Н.А., Мартынова В.П., Самойлов Д.В., Ельцов А.В. Журн. общей химии. 2002. Т. 72. Вып. 5. С. 839-847.
315. Silcoff E.R., Sheradsky T. New J. Chem. 1999. V. 23. P. 1187-1192.
316. Reichardt C. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3rd ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2003. 629 p.
317. Измайлов Н. А. Электрохимия растворов. Х.: изд. ХГУ, 1959. 958 с.
318. Фиалков Ю.Я. Растворитель как средство управления химическим процессом. Л.: Химия, 1990. 240 с.
319. Мchedlov-Петросян Н.О. Доклады АН СССР. 1987. Т. 293. № 5. С. 1178-1182.
320. Мchedlov-Петросян Н.О. Вестник Харьковского национального университета. 2002. № 573. Химия. Вып. 9 (32). С. 224-357.
321. Кабачник М.И. Усп. химии. 1979. Т. 48. № 9. С. 1523-1547.
322. Mchedlov-Petrosyan N.O., Kleshchevnikova V.N. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1994. V. 90. No. 4. P. 629-640.
323. Fompeydie D., Levillain P. Talanta. 1984. V. 31. No. 12. P. 1125-1128.
324. Мchedlov-Петросян Н.О. Журн. орган. химии. 1983. Т. 19. № 4. С. 797-805.
325. Мchedlov-Петросян Н.О., Рубцов М.И., Лукацкая Л.Л. Журн. общей химии. 2000. Т. 70. Вып. 8. С. 1255-1262; Chem. Abstr. 2001 : 135 : 312418.
326. Mitsuishi M., Aida G. Res. Rept. Fac. Text. a. Sericult. Shinshu Univ. 1959. No. 9. P. 177-180.
327. Мchedlov-Петросян Н.О., Миндрин В.Ф., Михайличенко Е.Н. УкрНИИТИ 868-Ук-Деп. 1986. 87 с.
328. Abdel-Halim F.M., Issa R.M., Hasanein A.A. UAR J.Chem. 1971.V. 14. No. 3. P. 275-286.
329. Dibbern-Brunelli D., Atvars T. D. Z. Spectroscopy Letters. 1990. V. 23. No. 5. P. 627-636.
330. Zipfel E., Grezes J.-R., Seiffert W., Zimmermann H.W. Histochemistry. 1982. B. 75. No. 4. S. 539-555.
331. Шахвердов Т.А. Опт. и спектр. 1975. Т. 39. № 4. С. 786-789.
332. Шахвердов Т.А., Тураева З.Н., Низамов Н., Ермолаев В.Л. Опт. и спектр. 1999. Т. 87. № 2. С. 253-257.
333. Шахвердов Т.А. Опт. и спектр. 2003. Т. 95. № 4. С. 614-623.
334. Шахвердов Т.А., Калинин В.Н., Эргашев Р. Опт. и спектр. 1986. Т. 61. № 3. С. 518-520.
335. Шахвердов Т.А., Эргашев Р. Опт. и спектр. 1999. Т. 87. № 2. С. 236-242.
336. Hojo M., Hasegawa H., Tsurui H., Kawamura K., Minami S., Mizobe A. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1998. V. 71. P. 1619-1627.
337. Hojo M., Ueda T., Yamasaki M., Inoue A., Tokita S., Yanagita M. Bull. Chem. Soc. Jpn. 2002. V. 75. P. 1569-1576.
338. Mchedlov-Petrosyan N.O., Vodolazkaya N.A., Surov Yu.N., Samoylov D.V. Spectrochim. Acta. A. 2005. In press.

339. Ищенко А.А., Деревянко Н.А., Попов С.В., Сломинский Ю.Л., Коваль В.Л., Шаповалов С.А., Мchedlov-Петросян Н.О. Известия АН. Сер. хим. 1997. № 5. С. 950-955.
340. Мchedlov-Петросян Н.О., Ключков В.К., Андриевский Г.В., Шумахер А.С., Клещевникова В.Н., Коваль В.Л., Шаповалов С.А., Деревянко Н.А., Ищенко А.А. Журн. научн. и прикл. фотографии и кинематографии. 2001. Т. 46. № 1. С. 3-12.
341. Shapovalov S.A., Koval V.L., Chernaya T.A., Pereverzev A.Yu., Derevyanko N.A., Ishchenko A.A., Mchedlov-Petrosyan N.O. J. Brazil. Chem. Soc. 2005. In press.
342. Шаповалов С.А., Черная Т.А., Коваль В.Л., Ищенко А.А., Мchedlov-Петросян Н.О. Вестник Харьковского университета. 1999. № 437. Химия. Вып. 3 (26). С. 138-140.
343. Жебентяев А.И., Мchedlov-Петросян Н.О. Журн.аналит.химии 1987. Т. 42. № 3. С. 518-524.
344. Жебентяев А.И., Мchedlov-Петросян Н.О. Известия вузов СССР. Химия и хим. технология. 1987. Т. 30. № 6. С. 30-33.
345. Davies M., Jones R. L. J. Chem. Soc. 1954. P. 120-125.
346. Davies M., Jones R. L. J. Phys. et Radium. 1954. V. 15. No. 4. P. 305-306.
347. Graichen C., Molitor J.C. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. 1959. V. 42. P. 149-161.
348. Скляр Ю.Е., Михайлов Г.И. Журн. орг. химии. 1966. Т.2. № 5. С. 899-901.
349. Issa I.M., Issa R.M., Temerk Y.M., Ghonein M.M. Egypt. J. Chem. 1974. V. 17. No. 4. P. 391-399.
350. Markuszewski R., Diehl H. Talanta. 1980. V. 27. No. 11B. P. 937-946.
351. Lengyel J., Sara V., Krtil J., Moravec J., Vecernik J. Radiochem. Radioanal. Lett. 1982. V. 56. No. 2. P. 81-86.
352. Zhu H.R., Parker L. Chem. Phys. Lett. 1989. V. 162. No. 6. P. 424-430.
353. Osborn R.S., Rogers D. Acta Cryst. 1975. V. 31. P. 359-364.
354. Dubost J.P., Leger J.M., Colleter J.C., Levillain P., Fompeydie D. Compt. Rend. 1981. T. 292. No. 13. Ser.II. P. 965-968.
355. Полякова И.Н., Старикова З.А., Парусников Б.В., Красавин И.А., Добрякова Г.М., Жада-нов Б.В. Журн. структ. химии. 1984. Т. 25. № 5. С. 98-104.
356. Cody V. Acta Cryst. 1987. V. C43. No. 4. P. 705-707.
357. Kimura M. J. Heterocyclic Chem. 1987. V. 24. No. 1. P. 283-288.
358. Wang L.F., Song M.S., Liu P.Q., Chen Z.L. Chin. J. Org. Chem. 1988. V. 8. No. 3. P. 245-250.
359. Wang L.F., Wang.X., Peng Z.R., He F.Y., Wang Q. Acta Cryst. 1990. V. C46. No. 9. P. 1676-1678.
360. Tamura Z., Maeda M., Yamaguchi K. Jap. Pharm. Forum. 1997. V. 6. No. 3. P. 68-71.
361. Yamaguchi K., Tamura Z., Maeda M. Acta Cryst. 1997. V. C53. P. 284-285.
362. Tamura Z., Maeda M. Yakugaku Zasshi. 1997. V. 117. No. 10-11. P. 764-770.
363. Fompeydie D., Rabaron A., Levillian P., Bourdon R. J. Chem. Research (S). 1981. P. 350.
364. Fompeydie D., Rabaron A., Levillian P., Bourdon R. J. Chem. Research (M). 1981. P. 4049-4058.
365. Amat-Guerri F., Martin M.E., Martinez-Utrilla R., Pascual C. J. Chem. Research (S). 1988. P. 184-185.
366. Мchedlov-Петросян Н.О., Суров Ю.Н., Егорова С.И., Салинас Майорга Р., Ариас Кордова Э. Доклады АН СССР. 1991. Т. 317. № 1. С. 152-157.
367. Orndorff W.R., Hemmer A.J. J. Amer. Chem. Soc. 1927. V. 49. P. 1272-1280.
368. Карпер П. Курс органической химии. Л.: Гос. науч.-техн. изд. хим. лит-ры, 1960. 770 с.
369. Nagase Y., Ohno T., Goto T. J. Pharm. Soc. Jap. 1953. V. 73. P. 1033-1039.
370. Вандровский В.А., Любченко Л.С., Гудименко Ю.И., Стригуцкий В.П., Агабеков В.Е. Доклады АН СССР. 1987. Т. 295. № 2. С. 396-399.
371. Freedman H.H. In: Carbonium Ions. Ed.G.A.Olah, P.R. Schleyer. 1973. IV. Ch. 28. P.1501-1578.
372. Мchedlov-Петросян Н.О., Суров Ю.Н. Деп. ВИНТИ, 1988. № 2690-В88; Журн. прикл. спектроск. 1988. Т. 49. № 2. С. 337.
373. Мchedlov-Петросян Н.О., Суров Ю.Н., Трофимов В.А., Цивадзе А.Ю. Теор. и эксперим. химия. 1990. Т. 26. № 6. С.688-698.
374. Семенов А.Д., Дорофеенко Г.Н., Дуленко В.И. Химия гетероцикл.соед. 1966. № 1. С. 14-18.

375. Mchedlov-Petrossyan N.O., Shapovalov S.A., Egorova S.I., Kleshchevnikova V.N., Arias Cordova E. *Dyes and Pigments*. 1995. V. 28. No. 1. P. 7-18.
376. Мchedlov-Петросян Н.О., Логинова Л.П., Суров Ю.Н., Клещевникова В.Н., Холин Ю.В., Фык Н.В., Данильченко Е.С. Деп. В УкрНИИТИ, № 2808-Ук 88 от 3.11.88.
377. Низамов Н., Атаходжаев А.К. Изв. АН СССР. Сер. физ. 1980. Т. 44. № 4. С. 674-680.
378. Вискво Л. А. Материалы научно-исследовательской работы за 1939/40 учебный год. Украинский институт советской торговли. Харьков, 1940. С. 49-63.
379. Goto H. *Sci. Rep. Yohoku Imp. Univ.*, Ser. I. 1940. V. 28. P. 458-464.
380. Измайлов Н.А., Петров С.М., Головки А.П. Труды НИИ химии ХГУ. 1951. Т. 9. С. 183-188.
381. Shah J., Pant D.D. *Curr. Sci.* 1985. V. 54. No. 20. P. 1040-1043.
382. Batscha B. *Chem. Ber.* 1926. Bd. 59. No. 1. S. 311-315.
383. Ахметова С.Д., Матвеев М.А., Щербов Д.П., В сб. Исследования в области химических и физических методов анализа минерального сырья. Вып. 6. Алма-Ата: ОНТИ КазИМС, 1977. С. 77-80.
384. Reisfeld R., Eyal M., Gvishi R. *Chem. Phys. Lett.* 1987. V. 138. No. 4. P. 377-383.
385. Choi M. M. F. J. *Photochem. Photobiol. A. Chemistry*. 1998. V. 114. P. 235-239.
386. Lindqvist L., Lundeen G.W. J. *Chem. Phys.* 1966. V. 44. P. 1711-1712.
387. Shah J., Yoshi N.B., Pant D.D. *Indian J. Pure a. Appl. Phys.* 1983. V. 21. P. 677-679.
388. Cernai K., Novakov M. *Zbornik. Review of Research, University of Novi Sad*. 1984. V. 14. P. 71-76.
389. Weller A. *Naturwiss.* 1955. Bd. 42. S. 175-176.
390. Мартынов И.Ю., Демяшкевич А.Б., Ужинов Б.М., Кузьмин М.Г. Успехи химии. 1977. Т. 44. № 1. С. 3-31; Рубеко Л.М., Ужинов Б.М. Журн. прикл. спектроск. 1979. Т. 31. № 4. С. 734-736.
391. Burak F. *Acta Phys. Polon.* 1981. V. A60. No. 2. P. 261-266.
392. Linden S.M., Neckers D.C. *Photochem. Photobiol.* 1988. V. 47. No. 4. P. 543-550.
393. Gollnick K., Schenck G.O. *Pure a. Appl.Chem.* 1964. V. 9. P. 507-525.
394. Murasecco-Suardi P., Gassmann E., Braun A.M., Oliveros E. *Helv. Chim. Acta*. 1987. V. 70. P. 1760-1773.
395. Burget D., Fouassier J.P. J. *Chem. Soc., Faraday Trans.* 1998. V. 94. No. 13. P. 1849-1854.
396. Krüger U., Memming R. *Ber. Bunsenges. phys. Chem.* 1974. Bd. 78. S. 670-692.
397. Niizyma S., Kikuchi K., Kokubun H. J. *Photochem.* 1987. V. 36. V. 51-62.
398. Jones G., Chatterjee S. J. *Phys. Chem.* 1988. V. 92. P. 6862-6864.
399. Brezová V., Pigošová J., Havlíková B., Dvoranová D., Ďurovič M. *Dyes a. Pigments*. 2004. V. 61. P. 177-198.
400. Kolthoff I.M., Lingane J.J. *Polarography*. 2nd Ed. Interscience Puplichers., N.Y., L., 1952.
401. Issa I.M., El-Samahy A.A., Issa R.M., Ghoneim M.M. *Electrochim. Acta*. 1972. V. 17. P. 1195-1202.
402. Issa I.M., Issa R.M., Ghoneim M.M., Temerk Y.M. *Electrochim. Acta*. 1973. V. 18. P. 265-270.
403. Ельцов А.В., Смирнова Н.П., Бобровников М.Н., Стратонникова Е.А., Захарова Г.В. Журн. общей химии. 1988. Т. 58. Вып. 3. С. 635-641.
404. Compton R.G., Mason D., Unwin P.R. J. *Chem. Soc., Faraday Trans.* 1988. V. 84. No 2. P. 483-489.
405. Майрановский С.Г. В кн. Вольтамперометрия органических и неорганических соединений. Под ред. П.К. Агасяна и С.И. Жданова. М.: Наука, 1985. 248 с.
406. Майрановский С.Г., Страдынь Я.П., Безуглый В.Д. Полярография в органической химии. Л.: Химия, 1975. 352 с.
407. Bordwell F.G., Drucker G.E., Andersen N.H., Denniston A.D. J. *Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. No. 23. P. 7310-7313.
408. Klein U.K.A., Hafner F.M. *Chem. Phys. Lett.* 1976. V. 43. No. 1. P. 141; Григорьева Т.М., Иванов В.А., Низамов Н., Кузьмин М.Г. Докл. АН СССР. 1977. Т. 232. № 5. С. 1108-1111.
409. Karpiuk J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003. V. 5. P. 1078-1090.
410. Bizjak T., Karpiuk J., Lochbrunner S., Riedle E. J. *Phys. Chem. A*. 2004. V. 108. No. 49. P. 10763-10769.

411. Karpiuk J. J. Phys. Chem. A. 2004. V. 108. No. 51. P. 11183-11195.
412. Назаренко В. А., Антонович В. П. Триоксифлуороны. М.: Наука, 1973. 182 с.
413. Антонович В.П., Новоселова М.М., Назаренко В.А. Журн.аналит.химии. 1984. Т. 39. № 7. С. 1157-1176.
414. Nazarenko V.A., Antonovich V.P., Veschikova N.A. Talanta. 1987. V. 34. No. 1. P. 215-218.
415. Bishop J.A., Wagner A. J. Luminescence. 1981. V. 26. P. 189-195.
416. Абросимова Н.В., Степанова А.Г., Красавин И.А., Парусников Б.В. Журн. прикл. спектроск. 1988. Т. 48. № 6. С. 941-946.
417. Степанова А.Г., Абросимова Н.В. Журн.аналит.химии. 1982. Т. 37. № 2. С. 311-314.
418. Willwohl H., Wolfrum J., Gleiter R. Laser Chem. 1989. V. 10. No. 2. P. 63-72.
419. Adamczyk M., Grote J. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000. V. 10. P. 1539-1541; 2003. V. 13. P. 2327-2330.
420. Miljanić S., Cimerman Z., Frkanec L., Žinić M. Analyt. Chim. Acta. 2002. V. 468. P. 13-25.
421. Пилипенко А.Т., Тананайко М.М. Разнолигандные и разнометалльные комплексы и их применение в аналитической химии. М.: Химия, 1983. 224 с.
422. Кузнецов В.В. Усп. химии. 1986. Т. 55. № 9. С. 1409-1433.
423. Мchedlov-Петросян Н.О., Егорова С.И., Ариас Кордова Э. Доклады АН СССР. 1992. Т. 323. № 4. С. 696-701.
424. Mchedlov-Petrosyan N.O., Egorova S.I., Arias Cordova E. ISECOS-92 Voronezh 1992. V. 1. P. 92-94; 174-176; 177-179.
425. Мchedlov-Петросян Н.О., Ариас Кордова Э., Шаповалов С.А. Вестник ХГУ. 1993. № 377. С. 47-51.
426. Мchedlov-Петросян Н.О., Егорова С.И., Ариас Кордова Э. Журн.аналит.химии 1994. Т. 49. № 11. С. 1177-1183.
427. Hebbink G.A., Grave L., Woldering L.A., Reinhoudt D.N., van Veggel F.C.J.M., J. Phys. Chem. A. 2003. V. 107. No. 14. P. 2483-2491.
428. Leow E.K.L., Slep L.D., Chibisov A.K., Braslavsky S.E. J. Phys. Chem. A. 2003. V. 107. No. 4. P. 439-446.
429. Bhobe R.A. J. Indian Chem. Soc. 1975. V. 52. No. 5. P. 390-393.
430. Bhobe R.A. J. Indian Chem. Soc. 1977. V. 54. No. 4. P. 344-346.
431. Bhobe R.A. J. Indian Chem. Soc. 1977. V. 54. No. 4. P. 347-349.
432. Wang L.-F., Wu J.-G., Ma Z.-L., Zhang F.-Q., Yan G.-H., He F.-Y., Wang Q. Acta Chim. Sin. 1986. V. 44. P. 616-618.
433. Tezak D., Filipcic I. Kem. Industr. 1981. V. 30. No. 10. P. 589-592.
434. Логинова Л.П., Мchedlov-Петросян Н.О. Вестник ХГУ. 1989. № 340. С. 65-71.
435. Мchedlov-Петросян Н.О., Логинова Л.П. Журн. неорг. химии. 1989. Т. 34. № 7. С. 1776-1779.
436. Тананайко М.М., Горенштейн Л.И. Укр. хим. журнал. 1974. Т. 40. № 3. С. 275-277.
437. Талипов М.Т., Зельцер Л.Е., Ташходжаев А.Т. Изв. вузов СССР. Химия и хим. технология. 1973. Т. 16. № 2. С. 299-300.
438. Чернова М.А., Фрумина Н.С. Журн.аналит.химии. 1977. Т. 32. № 12. С. 2319-2323.
439. Bogner J., Sarosi S. Acta Chimica Acad. Sci. Hungaricae. 1954. T. 7. Fasc. 3-4. P. 361-371.
440. Rossetti R., Brus L.E. J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. No. 16. P. 4336-4340.
441. Hildebrandt P., Stockburger. J. Raman Spectrosc. 1986. V. 17. No. 1. P. 55-58.
442. Su G.-J., Yin S.-X., Wan L.-J., Zhao J.-C., Bai C.-L. Surface Sci. 2004. V. 551. P. 204-212.
443. Prokopenko S.L., Osipov V.V. Theoretical a. Experimental Chem. 2003. V. 39. No. 6. P. 347-351.
444. Мchedlov-Петросян Н.О., Клещевникова В.Н., Рубцов М.И., Лукацкая Л.Л., Салинас Майорга Р., Кухтик В.И. Доклады АН СССР. 1989. Т. 308. № 1. С. 122-126.
445. Мchedlov-Петросян Н.О., Клещевникова В.Н. Журн. общей химии. 1990. Т.60. №4. С.900-911.
446. Мchedlov-Петросян Н.О., Клещевникова В.Н. Доклады АН СССР. 1990. Т. 312. № 2. С. 397-402.
447. Мchedlov-Петросян Н.О., Клещевникова В.Н. Вестник ХГУ. 1993. № 378. С.65-71.
448. Loginova L.P., Samokhina L.V., Mchedlov-Petrosyan N.O., Alekseeva V.I., Savvina L.P. Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspect. 2001. V. 193. No 1-3. P. 207-219.

449. Mchedlov-Petrossyan N.O., Vodolazkaya N.A. <http://preprint.chemweb.com/physchem/0404005>.
450. Mchedlov-Petrossyan N.O., Vodolazkaya N.A., Doroshenko A.O. J. Fluorescence. 2003. V.13. No 3. 235-248.
451. Мchedlov-Петросян Н.О., Рубцов М.И., Лукацкая Л.Л., Черная Т.А., Переверзев А.Ю. Доклады АН СССР. 1988. Т. 299. № 4. С. 921-925.
452. Мchedlov-Петросян Н.О., Рубцов М.И., Лукацкая Л.Л. Межвузовский сборник "Проявление природы растворителя в термодинамических свойствах растворов". Иваново. 1989. С. 86-92.
453. Мchedlov-Петросян Н.О., Рубцов М.И., Лукацкая Л.Л. Украинский химический журнал. 1990. Т.56. №1. С.69-75.
454. Mchedlov - Petrossyan N.O., Gorbenko G.P., Vodolazkaya T.A., Alekseeva V.I., Savvina L.P. Functional Materials. 2000. T. 7. No. 1. С. 138-143.
455. Mchedlov-Petrossyan N.O., Timiy A.V., Vodolazkaya N.A. Вестник Харьковского национального университета. 2002. № 549. Химия. Вып. 8(31). С. 144-157. <http://preprint.chemweb.com/physchem/0203011>.
456. Funasaki N. Nippon Kagaku Kaishi. 1976. V. 5. No. 5. P. 722-726.
457. Fernandes M.S., Fromherz P. J. Phys. Chem. 1977. V. 81. No. 18. P. 1755-1761.
458. Drummond C.J., Grieser F., Healy T.W. Faraday Discuss. Chem. Soc. 1986. V. 81. P. 95-106.
459. Drummond C.J., Grieser F., Healy T.W. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1989. V. 85. No. 3. P. 521-536; 537-550; 551-560; 561-578.
460. Saha S.K., Tiwari P.K., Dogra S.K. J. Phys. Chem. 1994. V. 98. No. 23. P. 5953-5955.
461. Мchedlov-Петросян Н.О., Исаенко Ю.В., Саламанова Н.В., Алексеева В.И., Саввина Л.П. Журн.аналит.химии. 2003. Т. 58. № 11. С. 1140-1154.
462. Саламанова Н.В., Водолазкая Н.А., Мchedlov-Петросян Н.О. Вестник Харьковского национального университета. 2003. № 596. Химия. Вып. 10 (33). С. 137-141.
463. Lovelock J.E., Nash T. Nature. 1958. No. 4618. P. 1263-1264.
464. Mishra V.N., Datt N. Ind. J. Chem. 1985. V. 24 A. No. 7. P. 597-600.
465. Mishra V.N. Acta Chim. Hung. 1984. V. 116. No. 1. P. 5-12.
466. Назаренко В.А., Новоселова М.М., Антонович В.П. Доклады АН УССР. 1980. Сер. Б. Вып. 6. С. 53-56.
467. Zaslavsky B.Yu., Miheeva L.M., Gulaeva N.D., Borovskaya A.A., Rubtsov M.I., Lukatskaya L.L., Mchedlov-Petrossyan N.O. J. Chem. Soc., Faraday Transactions. 1991. V. 87. No. 7. P. 931-938.
468. Nash T. J. Chem. a. Ind. 1958. P. 590.
469. Шинода К., Накагава Т., Тамамуси Б., Исемура Т. Коллоидные поверхностно-активные вещества. М.: Мир, 1966. 320 с.
470. Саввин С.Б., Чернова Р.К., Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества (Аналитические реагенты). М.: Наука, 1991. 251 с.
471. Жебентяев А.И., Жерносек А.К., Егорова С.И., Мchedlov-Петросян Н.О. Журн.аналит.химии. 1997. Т.52. № 9. С.946-953.
472. Fan G., Guo K. Fenxi huaxue, Anal. Chem. 1983. V. 11. No. 2. P. 130-131.
473. Sumina E.G., Smushkina E.V., Tyurina N.V. J. Planar Chromatogr. – Modern TLC. 1999. V. 12. No. 2. P. 129-134.
474. Малеваный С.В., Водолазкая Н.А., Мchedlov-Петросян Н.О., Орлов В.Д. Вестник Харьковского национального университета. 2000. № 495. Химия. Выпуск 6(29). С. 34-39.
475. Малеваный С.В., Водолазкая Н.А., Мchedlov-Петросян Н.О., Орлов В.Д. Фарм. журнал 2002. Т.33. № 1. С. 44-46.
476. Малеваный С.В., Водолазкая Н.А., Орлов В.Д., Мchedlov-Петросян Н.О. Вестник национального технического университета («ХПИ»). 2002. Вып. 17. С. 85-91.
477. Малеваный С.В., Водолазкая Н.А., Мchedlov-Петросян Н.О., Орлов В.Д.Доповіді НАН України. 2003. №1. С. 145-148.
478. Polewski K., Napierala D. Carbohydrate Res. 1999. V. 315. P. 35-47.

Поступила в редакцию 9 ноября 2004 г.

Kharkov University Bulletin. 2004. №626. Chemical Series. Issue 11(34). N. O. Mchedlov-Petrosyan. Fluorescein dyes in solutions: well studied systems?

In this review with 478 references, the results of systematic studies in the field of ionic equilibria of fluorescein and its derivatives and analogues in solutions are summarized up. The pK_a values and electronic absorption spectra of ionic and molecular species in different solvents (methanol, N,N-dimethylformamide, mixtures of water with acetone, dimethyl sulfoxide, 1,4-dioxane, ethanol, n-butanol, aqueous micellar solutions of colloidal surfactants) are presented. The data for twenty eight dyes, namely hydroxyxanthenes, such as fluorescein, its halogen and nitro derivatives etc., and their thioanalogues as well as of phenolphthalein and five aminoxanthenes reported by the author and his co-workers within past three decades are compiled in 25 tables and 35 figures and compared with those obtained by other research groups. The medium effects on stepwise dissociation constants and tautomeric conversions of fluorescein dyes both in true and organized solutions are considered. The character of IR spectra in solid state and in solution confirms the general scheme of detailed protolytic equilibrium deduced first of all from Vis spectra. The problems of acid-base equilibria of fluorescein in excited state, of electroreduction on dropping mercury electrode, and of interactions with metal ions are briefly discussed. The equilibrium parameters of fluorescein dyes in the two-phase system water/chloroform are determined. The 'apparent' values, pK_a^a , obtained in micellar solutions of cationic, non-ionic, and anionic surfactants, are tabulated. Some unsolved problems of the state and reactivity of aforesaid dyes in solutions are noted.